

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA GLINSKI PESSOTTO



EFEITOS DA MISTURA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E METAIS NÃO
ESSENCIAIS NA LINHAGEM DE MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7

CURITIBA

2017

ANDRESSA GLINSKI PESSOTTO

EFEITOS DA MISTURA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E METAIS NÃO
ESSENCIAIS NA LINHAGEM DE MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Pessotto, Andressa Glinski

Efeitos da mistura de nanopartículas de prata e metais não essenciais na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. / Andressa Glinski Pessotto. – Curitiba, 2017.

96 p.: il.

Orientador: Francisco Filipak Neto

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Nanopartículas. 2. Prata. 3. Cadmio. 4. Chumbo. 5. Mercúrio. 6. Macrófagos. I. Título. II. Filipak Neto, Francisco, 1981-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 571.6

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR

aprovada

Francisco Filipak Neto

Prof. Dr. Julio César R. de Azevedo
Universidade Tecnológica Federal do Paraná-
UTFPR

APROVADA

Julio Cesar R. de Azevedo

Prof. Dr. Daniel Bussolaro
Instituto Federal do Paraná - IFPR

APROVADA

Daniel Bussolaro

Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez
Universidade Federal do Paraná - UFPR

aprovada

Glaucia Regina Martinez

Profa. Dra. Lia Sumie Nakao
Universidade Federal do Paraná - UFPR

aprovada

Lia Sumie Nakao

E tendo como suplente,

Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Após arguir a candidata **Andressa Glinski Pessotto**, em relação ao seu trabalho intitulado: “Efeitos da mistura de Nanopartículas de Prata e Metais não essenciais na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7”, são de parecer favorável à aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Junho de 2017

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

A meus avós Izulina e Darci Moreira (*in memoriam*),
pessoas de muita **coragem, fé e retidão.**

A meus pais, Avanir e Vitorio, que me ensinaram a importância da
humildade, determinação e perseverança.

A meu esposo Diogo, que somou à minha vida **ética e amor,**
valores contidos nesse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que me ensinaram, ajudaram, apoiaram e graças a elas encerro mais uma importante etapa na minha vida. Agradeço de coração:

À Universidade Federal do Paraná, em especial aos professores pelo comprometimento com o ensino de qualidade.

Ao meu orientador, Francisco, vulgo Chico, por todos esses anos de orientação, dedicação, confiança no meu trabalho, conferindo-me autonomia e colaborando com meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao Professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, por abrir as portas do seu laboratório, me acolher no meio científico e dar suporte aos projetos desenvolvidos ao longo desses 10 anos.

Ao Professor Arandi G. Bezerra Junior por toda a colaboração com as nanopartículas.

À Professora Carolina Camargo de Oliveira, pela disponibilidade e auxílio com o citômetro de fluxo, com os resultados e por sempre me socorrer com algum reagente ou material necessário.

À Carmen Lucia Voigt, pelo auxílio com as análises das nanopartículas.

À CAPES pelo apoio financeiro que tornou possível a realização dessa pesquisa.

À Professora Celia Regina C. Franco pela avaliação criteriosa dos relatórios, apresentações anuais e pelas valiosas contribuições. Admiro-lhe desde o primeiro dia de aula na graduação e o convívio contigo foi para mim um aprendizado singular.

À Professora Sonia Regina Grotzner, pessoa incrível, professora fantástica, amiga de todas as horas e conselheira! Tive a sorte de ser sua aluna por duas vezes e amadurecer profissionalmente assistindo suas aulas! Você será lembrada sempre com muito carinho e em cada sala de aula que eu entrar tentarei ser um pouquinho daquilo que aprendi com você!!!

Ao Professor Marco Randi, por mostrar-me uma forma diferente de pensar, de construir uma aula e de abandonar padrões impostos.

À Katia Fialho do Nascimento, por me auxiliar com as células.

Aos colegas do LabToxCel, Renata, Gabriel Leão, Flávia, Ana, Inês, Rodrigo, Ellie, Ivaldete que durante esse longo tempo compartilharam reagentes, espaços, equipamentos, alegrias, tristezas e discussões científicas.

Aos meus colegas de longa data, que se tornaram grandes amigos: Samuel, por toda a sua serenidade, comprometimento, profissionalismo e companhia; foi um prazer dividir a bancada contigo, além dos sucessos e insucessos que só o cultivo celular proporciona. Dani, minha amora, pela amizade de todas as horas, cumplicidade e irreverência que alegrava e agitava o laboratório e nossos dias. Dandie, meu técnico de TI preferido, por todo auxílio, pelas calorosas discussões, coxinhas na cantina e pela parceria de sempre!

Aos “novos” colegas, que chegaram ao cultivo celular nos últimos dois anos da minha jornada: Ludiana, Marcelle, Gis, Helena, Benísio e Patricia. Obrigada por todo o apoio, auxílio, momentos de descontração, cafezinhos na cantina, discussões, relatos, cantorias, enfim, por deixarem meus dias mais agradáveis, principalmente quando algum experimento não dava certo. Vocês foram muito importantes!!!

De forma especial, à Nilce e à Maristela, por todo o comprometimento, profissionalismo e auxílio com os experimentos das proteínas. Vocês foram essenciais e muito generosas comigo.

Aos professores, técnicos e colegas da pós graduação por prontamente me atenderem nos momentos de dúvidas, com o empréstimo de reagentes, protocolos, materiais e equipamentos.

Ao Israel, por toda o profissionalismo e auxílio com o microscópio confocal.

À Marlene e Mirian, por todo auxílio, pela disponibilidade e por facilitarem tantos detalhes e processos burocráticos.

À Elaine Suacki, pela amizade, auxílio, apoio e por não medir esforços em me ajudar.

Aos meus grandes amigos (Marília, Ricardo, Guinho, Jenifer, Fátima, Irineu, Suzana Diego, Mariana, Ana Lucia, Jaque) que por vários anos compreenderam minha ausência e sempre me incentivaram. Agora sim, podemos marcar nossos encontros!

À minha família, por ser presença em minha vida. Momentos como os almoços de domingo eram para mim como uma recarga de energia. Lembrarei sempre dos meus irmãos descontraindo, meus queridos sobrinhos brincando e alegrando a casa, Tia Glaci com sua serenidade e sabedoria me incentivando, minha sogra sempre na torcida, mas em especial minha mãe, que com um amor imenso, me ajudou sempre que podia, rezou tantas e tantas vezes e sempre me apoiou!

Ao Diogo, meu companheiro de todas as horas e também de vida acadêmica. Obrigada por me compreender e apoiar meus ideais. Obrigada por me incentivar a prosseguir sempre. Obrigada por me acompanhar nos finais de semana ao laboratório, dividindo gentilmente o fardo comigo. Faltam palavras para expressar quão especial e importante você é na minha vida!

Sobretudo a Deus, pelo dom da vida, pela saúde, pela paz que me conforta nos momentos difíceis, pelo amor que me sustenta, pelas pessoas maravilhosas que encontrei ao longo do caminho e pelas oportunidades que me trouxeram até aqui, fato que me inclui em uma minoria privilegiada da sociedade, num mundo onde poucos têm a alegria de estar próximo à arte do saber.

“Não sei se a vida é curta ou longa demais para nós. Mas sei que nada do que vivemos tem sentido se não tocarmos o coração das pessoas” (Cora Coralina)

RESUMO

A nanotecnologia vem ocupando lugar de destaque na economia e na ciência devido às propriedades dos nanomateriais, o que os leva a ser amplamente utilizados na indústria e na pesquisa. No entanto, as nanopartículas podem representar riscos para os organismos vivos, devido a suas propriedades pró-oxidantes e de adsorção, principalmente ao coexistir em corpos de água com outros contaminantes, já conhecidos pela sua toxicidade. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de nanopartículas de prata (NPs-Ag), metais não essenciais e sua associação, na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. As células foram expostas a duas concentrações de NPs-Ag (0,36 e 3,6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), duas concentrações de cloreto de Cádmio (1 e 10 μM), duas concentrações de nitrato de Chumbo (25 e 250 μM) e duas concentrações de cloreto de Mercúrio (15 e 150 μM). Tais concentrações foram determinadas após um *screening*, com seleção de uma concentração próxima do valor da CL_{50} e outra concentração 10X menor, cujo efeito sobre a viabilidade das células não fosse pronunciado. As associações desses contaminantes foram determinadas de forma que as duas concentrações de nanopartículas fossem combinadas com cada concentração dos metais (Cd, Hg e Pb), completando juntamente com o grupo controle 21 grupos experimentais. Ensaio de viabilidade celular, citotoxicidade, concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO), morte celular, atividade fagocítica, dano ao DNA, potencial de membrana mitocondrial e expressão de proteínas anti-apoptóticas foram realizados após 4, 8 e 24 h de exposição aos contaminantes. As nanopartículas possuem forma arredondada, reduzido tamanho (1 a 4 nm) e são estáveis. Os ensaios de viabilidade celular, citotoxicidade, produção de EROs e de NO, morte celular apontam que após 24 h de exposição a associação dos contaminantes foram mais deletéria em comparação aos contaminantes de forma isolada. Em 4 h de exposição foi possível verificar que há recrutamento do sistema de reparo do DNA, aumento da atividade de desidrogenases e dos níveis de EROs, sugerindo que essa via pode estar desencadeando a morte celular por apoptose. Isso foi parcialmente confirmado após 8 h de exposição, com a diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica XIAP. Nessa perspectiva, esse trabalho demonstra que a associação dos contaminantes conduz a efeitos que não foram observados ou previsíveis pela exposição isolada.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata, Cádmio, Chumbo, Mercúrio, macrófagos murinos.

ABSTRACT

Nanotechnology has been prominent in economics and science due to the properties of nanomaterials, which leads them to be widely used in industry and research. However, nanoparticles can pose risks to living organisms due to their pro-oxidant and adsorption properties, especially when coexisting in bodies of water with other contaminants, already known for their toxicity. Thus, the objective of the present study is to evaluate the effects of silver nanoparticles (NPs-Ag), non-essential metals and their association in the murine macrophages RAW 264.7. Cells were exposed to two concentrations of NPs-Ag (0.36 and 3.6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), two concentrations of Cadmium chloride (1 and 10 μM), two concentrations of Lead nitrate (25 and 250 μM) and two concentrations of Mercury chloride (15 and 150 μM). These concentrations were determined after a screening, with a concentration close to the LC 50 value and another 10X lower concentration, whose effect on cell viability was not pronounced. The associations of these contaminants were determined so that the two concentrations of nanoparticles were combined with each concentration of the metals (Cd, Hg and Pb), completing together with the control group 21 experimental groups. Cell viability assays, cytotoxicity, cell proliferation, concentration of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), cell death, phagocytic activity, DNA damage, mitochondrial membrane potential and expression of anti-apoptotic proteins were performed after 4, 8 and 24 h exposure to the contaminants. The nanoparticles have rounded shape, reduced size (1 to 4 nm) and are stable. The cell viability assays, cytotoxicity, ROS and NO production, cell death indicate that after 24 h of exposure the association of contaminants is more deleterious in comparison to contaminants in isolation. In 4 h of exposure it is possible to verify that there is a recruitment of the DNA repair system, increase activity of dehydrogenases and the levels of ROS already present an increase in relation to the control group, suggesting that this path may be triggering the cell death by apoptosis. This is partially confirmed after 8 h of exposure, with decreased expression of the anti-apoptotic protein XIAP. From this perspective, this work demonstrates that the association of contaminants leads to effects that are not observed or predicted by isolated exposure.

Keywords: Silver nanoparticles, Cadmium, Lead, Mercury, murine macrophages

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais fontes, rotas de exposição e processos de interação das nanopartículas com o ambiente e organismos vivos.....	23
Figura 2. Linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 aderidas à garrafa	32
Figura 3. Método de ablação a laser utilizado para a síntese das nanopartículas de prata.....	34
Figura 4. Fagocitose de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pelas células RAW 264.7..	40
Figura 5. Aspecto da suspensão de NPs-Ag.....	45
Figura 6. Banda SPR típica de NPs-Ag esféricas.....	46
Figura 7. Espectro de absorção UV/Vis da amostra de NPs-Ag em água.....	46
Figura 8. DLS da suspensão de NPs-Ag.....	48
Figura 9. DLS da mesma amostra de NPs-Ag.....	49
Figura 10. Potencial Zeta das NPs-Ag em água e em meio de cultura.....	50
Figura 11. MET de uma amostra de NPs-Ag.....	51
Figura 12. Citotoxicidade (MTT e Vermelho Neutro e Cristal violeta) após 4h, 24h e 48h de cultivo, com diferentes concentrações de SFB.....	53
Figura 13. <i>Screening</i> das concentrações de Nanopartículas de Prata após 24 h de exposição, através dos ensaios de citotoxicidade (MTT e Vermelho Neutro) para selecionar as concentrações utilizadas no presente estudo.....	54
Figura 14. <i>Screening</i> das concentrações de Cloreto de Cádmio após 24 h de exposição, através dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro para selecionar as concentrações utilizadas no presente estudo.....	55

Figura 15. Screening das concentrações de Nitrato de Chumbo após 24 h de exposição, através dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro para selecionar as concentrações utilizadas no presente estudo.....	56
Figura 16. Screening das concentrações de Cloreto de Mercúrio após 24 h de exposição, através dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro para selecionar as concentrações utilizadas no presente estudo.....	57
Figura 17. Citotoxicidade pelo ensaio de exclusão do Azul de Tripán após 24 h de exposição.....	58
Figura 18. Aspecto visual da citotoxicidade pelo ensaio de exclusão do Azul de Tripán após 24 h de exposição.....	59
Figura 19. Citotoxicidade pelo ensaio de MTT após 4 h e 24 h de exposição.....	61
Figura 20. Citotoxicidade pelo ensaio de Retenção do Vermelho Neutro após 24 h de exposição.....	62
Figura 21. Citotoxicidade pelo ensaio do Cristal Violeta após 24 h de exposição.....	64
Figura 22. Níveis de espécies reativas de oxigênio após 4 e 24 horas de exposição aos contaminantes, normalizados pela viabilidade celular determinada pelo ensaio do azul de tripan.....	65
Figura 23. Níveis de Óxido Nítrico após 4 e 24 horas de exposição aos contaminantes, normalizados pela viabilidade celular determinada pelo ensaio do azul de tripan.....	67
Figura 24. Atividade fagocítica após 4 h de exposição.....	69
Figura 25. Potencial da membrana mitocondrial após 4 h de exposição.....	70
Figura 26. Focos de reparo de DNA após a exposição de 4 h sob microscópio confocal.....	71

Figura 27. Porcentagem de núcleos com diferentes classes de focos de reparo de DNA após a exposição de 4 h.....	72
Figura 28. Co-localização das NPs-Ag e compartimentos ácidos sob microscópio confocal.....	73
Figura 29. Detecção de fluorescência por <i>Hoechst</i> (marcador de DNA-azul), <i>Leadmium</i> (sonda específica para Cd e Pb - verde), <i>Lysotracker</i> (marcador de compartimentos ácidos-vermelho).....	74
Figura 30. Taxas de viabilidade celular, apoptose inicial, e apoptose final + necrose após 24 h de exposição.....	76
Figura 31. Imagens de <i>Time-lapse</i> das células RAW 264.7 expostas a NPs-Ag, Cd e NPs+Ag + Cd durante 24 h em meio de cultura DMEM, 5% de CO ₂ e 37 °C.....	78
Figura 32. Expressão de proteínas XIAP e BCL-2 após 8 h de exposição a 3.6 µg.ml ⁻¹ de NPs-Ag, 10 µM de Cd, 25 µM de Pb e suas misturas.....	79
Figura 33. Via simplificada da apoptose.....	80
Figura 34. Principais efeitos em células RAW 264.7 após 4, 8 e 24 h de co-exposição à 3.6 µg.ml ⁻¹ de nanopartículas de prata e 10 µM de Cloreto de Cádmio (NP 3,6 + Cd 10).....	81
Figura 35. Principais efeitos em células RAW 264.7 após 4 e 24 h de co-exposição à 3.6 µg.ml ⁻¹ de nanopartículas de prata e 25 µM de Nitrato de Chumbo (NP 3,6 + Pb 25).....	82
Figura 36. Principais efeitos em células RAW 264.7 após 4 e 24 h de co-exposição à 3.6 µg.ml ⁻¹ de nanopartículas de prata e 150 µM de Cloreto de Mercúrio (NP 3,6 + Hg 150).....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais	36
Tabela 2. Tempo que inicia os estágios de apoptose inicial e apoptose final.....	77

LISTA DE SIGLAS

ATCC - coleção de cultura americana (do inglês *American Type Culture Collection*)

Cd - Cádmio

CdCl_2 – Cloreto de Cádmio

CL_{50} - concentração letal média

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético (do inglês *Ethylenediaminetetracetic Acid*)

H_2O_2 - peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido Clorídrico

Hg - Mercúrio

HgCl_2 - Cloreto de Mercúrio

LR – baixo à direita- (do inglês low right)

MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio]

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm - nanometro

NP-Ag - nanopartícula de prata

NPs - nanopartículas

Pb - Chumbo

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ - Nitrato de Chumbo

PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline*)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês *sodium dodecyl-sulfate*)

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

λ de emissão - comprimento de onda de emissão

λ de excitação - comprimento de onda de excitação

\approx aproximadamente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Nanopartículas	22
2.1.1 Nanopartículas de prata (NPs-Ag)	24
2.2 Metais	25
2.2.1 Cádmio	26
2.2.2 Chumbo	26
2.2.3 Mercúrio	27
2.3 Modelo biológico	28
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Cultivo da linhagem celular.....	32
4.2 Plaqueamento	32
4.3 Seleção da concentração de soro fetal bovino	33
4.4 Síntese e caracterização das nanopartículas de prata	33
4.4.1 Síntese	33
4.4.2 Espectroscopia Ultravioleta-visível (UV-VIS).....	34
4.4.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	34
4.4.4 Potencial zeta	35
4.4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	35
4.4.6 Interferências com os reagentes/ensaios	35
4.5 Seleção das concentrações de NPs-Ag, Cd, Pb e Hg	35
4.6 Delineamento experimental	36
4.7 Ensaios de citotoxicidade	37
4.7.1 Exclusão do Azul de tripan	37
4.7.2. MTT	37
4.7.3 Retenção do Vermelho Neutro	38
4.7.4 Cristal violeta	38
4.8 Espécies reativas de oxigênio (EROs)	38

4.9 Óxido Nítrico (NO)	39
4.10 Atividade fagocítica	39
4.11 Potencial de Membrana Mitocondrial	40
4.12 Focos de reparo de DNA	41
4.13 Detecção Intracelular de NPs-Ag, Cd e Pb	41
4.14 Morte celular	42
4.15 Preparação dos lisados celulares e separação das proteínas	42
4.16 <i>Western Blotting</i>	43
4.17 Análises estatísticas	44
5. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	45
5.1 Síntese e caracterização das NPs-Ag	45
5.1.1 UV-VIS	45
5.1.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	47
5.1.3. Potencial Zeta	49
5.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	50
5.1.5 Interferências com os reagente/ensaios	51
5.2 Seleção da concentração de soro	51
5.3 Seleção da concentração dos contaminantes	53
5.3.1 Nanopartículas de prata	53
5.3.2 Cloreto de Cádmio	54
5.3.3 Nitrato de Chumbo	55
5.3.4 Cloreto de Mercúrio	56
5.4 Ensaios de citotoxicidade	57
5.4.1 Exclusão do Azul de tripan	57
5.4.2 MTT	60
5.4.3 Retenção do Vermelho Neutro	61
5.4.4 Cristal violeta	63
5.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs)	64
5.6 Óxido Nítrico (NO)	66
5.7 Atividade fagocítica	68
5.8 Potencial de Membrana Mitocondrial	69
5.9 Focos de reparo de DNA	70
5.10 Detecção Intracelular de NPs-Ag, Cd e Pb	73
5.11 Morte celular	74

5.11.1 Avaliação por <i>High Content Imaging</i>	75
5.11.2 Microscopia Confocal	76
5.12 <i>Western blotting</i>	79
5.13 Considerações Finais	81
6. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

O meio ambiente recebe continuamente substâncias químicas não essenciais para os sistemas biológicos (xenobióticos) liberadas a partir das mais diversas atividades antrópicas, como agrícolas, industriais e urbanas. A partir do século XX, milhares de poluentes orgânicos e inorgânicos, como as bifenilas policloradas (PCBs), compostos organoclorados (OCs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Almeida et al., 2007), policlorodibenzofuranos (PCDFs), policlorobenzodioxinas (PCDDs), metais (Van Der Oost et al., 2003) e mais recentemente os nanoresíduos (Klaine et al., 2008; Bundschuh et al., 2018) são produzidos e, inevitavelmente, liberados no meio ambiente. Como resultado, os ecossistemas aquáticos acabam sendo os receptáculos finais da maior parte dessas substâncias, isso devido a sua liberação direta ou a processos hidrológicos e atmosféricos (Stegeman e Hahn, 1994). Os efeitos isolados de determinadas classes ou tipos de poluentes têm sido objeto de diversos estudos. Entretanto, no ambiente natural, os organismos encontram-se expostos a misturas complexas e as investigações envolvendo algumas combinações de xenobióticos (efeitos de interações) são mais raras, dado as dificuldades impostas para avaliação do efeito de um conjunto de substâncias, o que representa, de fato, a situação mais próxima do encontrado no ambiente natural.

Metais não essenciais como o Cádmio, Chumbo e Mercúrio são onipresentes na natureza e representam um enorme risco ao meio ambiente e ao homem. As Nanopartículas caminham para o mesmo destino, devido a sua produção e uso desenfreados. Além disso, pouco se sabe sobre seus efeitos aos sistemas biológicos, em especial, quando na presença de outros contaminantes. Esses contaminantes possuem um grande potencial tóxico, não apenas para organismos aquáticos como também para populações humanas que são supridas com água de reservatórios de abastecimento público ou que se alimentam de organismos contaminados (via trófica). Dessa forma, há uma grande necessidade de desvendar os efeitos de misturas complexas que possam coexistir em ambientes naturais ou que possam chegar por meio de diferentes rotas ao mesmo receptor.

Diante dessa problemática, nesse trabalho foram investigados os efeitos de misturas contendo Nanopartículas de Prata, Cádmio, Chumbo e Mercúrio em modelo de células do sistema imunológico, os macrófagos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nanopartículas

Uma nanopartícula é definida como uma pequena partícula com dimensões na faixa de 1 a 100 nm que se comporta como uma unidade inteira em termos de transporte e propriedades (EPA, 2010).

Nanopartículas (NPs) estão presentes naturalmente na Terra, em pequenas quantidades, como produtos da combustão incompleta de combustíveis fósseis e erupção vulcânica (Nowack e Bucheli, 2007). Entretanto, são cada vez mais comuns no mercado e no ambiente natural (Nowack et al., 2012; Sun et al., 2014), graças ao desenvolvimento da nanotecnologia (EPA, 2007). Isso gera uma preocupação, dada a dificuldade de determinar a segurança dos nanomateriais, pois o conhecimento sobre sua toxicologia é pouco conhecida. A título de exemplo, pouco se conhece sobre o tempo que esses materiais ficam ativos no ambiente e sobre níveis seguros de exposição para humanos e para ecossistemas. Também não há registros de estudos de longo prazo. Ademais, não é comum a detecção, medição e monitoramento de nanomateriais fabricados e incorporados em produtos, assim como os seus rejeitos no ambiente.

A quantidade de produtos que utilizam nanotecnologia gera uma diversidade de resíduos e materiais que acabam por ser descartados, seja por não atingirem as especificações requeridas, por erros durante o processo de produção, ao longo do transporte, uso do produto final ou indiretamente por descarte dos produtos pelos consumidores após o uso (The Royal society and Royal academy of engineering, 2004; Muller e Nowack, 2008; McGillicuddy et al., 2017), resultando na contaminação de ambientes terrestres, atmosféricos e, sobretudo, os aquáticos, como demonstrado na Figura 1.

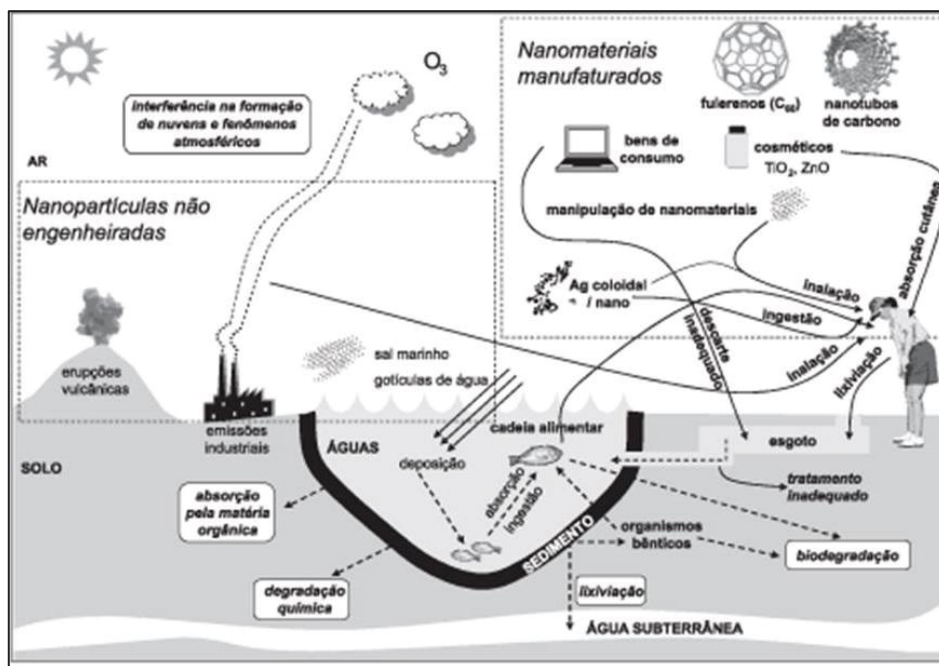


Figura 1. Principais fontes, rotas de exposição e processos de interação das nanopartículas com o ambiente e organismos vivos.

Fonte: Paschoalino et al. (2010)

Nesses ambientes, o destino e o comportamento das NPs são totalmente desconhecidos (Jiravova et al., 2016). Isso pode significar uma diversidade de sérios riscos ecológicos nunca vistos anteriormente. Os poucos estudos existentes sugerem que os microrganismos e as plantas podem produzir (Prasad, 2014) modificar e concentrar as nanopartículas, e que é possível ocorrer bioacumulação¹, ou mesmo biomagnificação².

Devido à ausência de conhecimento acerca desse assunto, alguns especialistas recomendam que a liberação de nanopartículas no meio ambiente seja reduzida ou até proibida. Como medida de precaução, recomendam que as fábricas e os laboratórios de pesquisa tratem as nanopartículas como se fossem resíduos tóxicos perigosos.

¹**Bioacumulação:** é a absorção e retenção do composto pelo organismo do meio abiótico ou biótico, podendo ou não a concentração exceder a da fonte (LEBLANC, 1995; D'AMATO et al., 2002).

²**Biomagnificação:** é o aumento da concentração do composto ao longo da cadeia alimentar, influenciada pela posição trófica do organismo, devido à elevada absorção e baixa eliminação do composto. Ocorre biomagnificação quando as concentrações do composto nos tecidos de um organismo excedem as concentrações do nível trófico adjacente inferior em mais de 100% (LEBLANC, 1995; D'AMATO et al., 2002).

2.1.1 Nanopartículas de Prata (NPs-Ag)

As nanopartículas de prata (NPs-Ag) estão entre as nanopartículas mais utilizadas, devido às suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas (Dong et al., 2012; Levard et al., 2013. Nocchetti et al., 2013), atingindo uma produção mundial estimada de 55 toneladas ou mais por ano (Piccinno et al., 2012). As NP-Ags são comercializadas na área da medicina como agentes antimicrobianos, veículos de entrega e biossensores (Asharani et al., 2009b). Também são incorporadas em produtos têxteis, na confecção de vestuário, roupas íntimas, na fabricação de materiais de aço inoxidável, tintas e filtros de água (Chen e Schluesener, 2008).

Baseado em modelos Gottschalk et al. (2009) relataram que as concentrações esperadas em água superficiais dos EUA estão entre 0,09 e 0,43 ng.L⁻¹ e entre 0,59 e 2,16 ng.L⁻¹ nas águas superficiais europeias, enquanto as concentrações totais de Ag previstas no rio Reno foram estimadas entre 40 e 320 ng.L⁻¹. Como já apresentado anteriormente a utilização em larga escala de nanopartículas tem, como consequência, a liberação de produtos residuais no ambiente (Massarki et al., 2014) e o risco de exposição humana e de outros organismos.

A exposição humana às nanopartículas ocorre através de inalação, contato dérmico e ingestão (Jiravova et al., 2016). Devido à forte afinidade da prata por grupos tióis, a biodisponibilidade³ das NPs contidas em produtos pode ser aumentada no ambiente fisiológico (Vrcek et al., 2014). Outras vias de entrada potenciais podem incluir o trato genital feminino (devido à incorporação de NPs-Ag em inúmeros produtos de higiene feminina), ou por incorporação através de implantes médicos, cateteres e curativos para feridas (Chen e Schluesener, 2008; Marambio-Jones e Hoek, 2010).

Nesse sentido, os mecanismos pelos quais as NPs são internalizadas pelas células de mamíferos podem ser pinocitose, endocitose dependente de cavéolas, balsas lipídicas ou clatrina e fagocitose (Tomankova et al., 2015). A possível entrada, cinética, localização intracelular e exocitose, no entanto,

³ **Biodisponibilidade:** é uma medida da extensão de um composto que atinge a circulação sistêmica e está disponível no local de ação (SHARGEL et al., 2005)

depende muito de características fundamentais como tamanho das NPs, características de superfície, potencial zeta⁴ e sua capacidade de evitar agregação. Por outro lado, a cinética de captação também é afetada pelo tipo celular (Asharani et al., 2009, Bartłomiejczyk et al., 2013).

Os estudos disponíveis na literatura indicam geralmente baixa toxicidade em concentrações ambientalmente relevantes de NPs-Ag. No entanto, coexposição com poluentes ubíquos deveria ser considerada na avaliação de riscos, uma vez que NPs-Ag podem induzir toxicidade por mecanismo de “Cavalo de Tróia” (Limbach et al., 2007; Lubick, 2008; Luoma, 2008; Yu et al., 2015). Autores propõem que as nanopartículas poderiam carrear poluentes adsorvidos à sua superfície, os quais normalmente teriam dificuldades em atravessar a barreira imposta pela membrana plasmática (Luoma, 2008; Limbach et al., 2007; Lubick, 2008; Park et al., 2010), funcionando como “Cavalos-de-Tróia” e facilitando a entrada de poluentes nas células (Hurt et al., 2006).

Entretanto, as investigações envolvendo misturas de xenobióticos são escassas na literatura, devido a dificuldades de logística, de interpretação de dados e de seleção de associações relevantes. Não obstante a essas dificuldades, os estudos de avaliação de risco não devem focar apenas na toxicidade inerente de nanopartículas, mas também considerar as possíveis interações com contaminantes ambientais existentes (Baun et al., 2008).

2.2 Metais

Entre os contaminantes mais intensamente estudados em ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos, estão os metais (Palenzuela et al., 2004). Alguns metais são poluentes em potencial e podem acumular nos organismos vivos, permanecendo assim por muito tempo biodisponíveis a outros extratos da cadeia alimentar. Metais não essenciais como, por exemplo, Cádmio, Mercúrio e Chumbo não apresentam funções fisiológicas, sendo tóxicos mesmo quando presentes em baixas concentrações, principalmente por meio de competição por sítios de ligação com os metais essenciais.

⁴ **Potencial zeta** é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade.

2.2.1 Cádmio

O Cádmio (Cd) é um elemento onipresente na Terra e amplamente distribuído no meio ambiente, considerado um carcinogênico tipo I pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC, 1993). Esse metal de transição ocorre naturalmente em minas de zinco, chumbo e cobre além de erupções vulcânicas e incêndios florestais, sendo que o Cd pode aderir em partículas e ser transportado pelo ar. O metal é muito utilizado na produção de baterias, estabilizadores, pigmentos, ligas metálicas e fertilizantes, os quais podem conter altas concentrações de cádmio (Filipc, 2012). Entretanto, a intoxicação na população em geral deve-se principalmente à ingestão de alimentos, cigarro, queima de combustíveis fósseis e à exposição a resíduos industriais.

Estima-se que a ingestão média seja de 8 a 25 µg por dia e 80% dessa seja derivava da alimentação, através do consumo de cereais, legumes e batatas. A absorção pela via gastrointestinal é de aproximadamente 5% mas pode chegar a 20% ou 30%. Também são absorvidos altos níveis de cádmio pela via respiratória, contato com o fumo de tabaco e exposição ocupacional (Sinicropi et al., 2010).

Apesar dos níveis de exposição ao Cádmio serem relativamente baixos, o Cd é um elemento persistente no ambiente (Sugita e Tsuchiya, 1995). É prontamente absorvido pelos organismos, e devido à sua baixa excreção e de um tempo de meia-vida biológico de 10 a 30 anos (McMurray e Tainer, 2003) é bioacumulado e biomagnificado ao longo da cadeia alimentar.

A toxicidade aguda por cádmio pode provocar danos ao pulmão, fígado, hemorragia, lesão testicular, podendo, em casos mais graves ser fatal. Já a exposição crônica ao cádmio pode provocar imunotoxicidade, nefrotoxicidade e osteotoxicidade (Sinicropi et al., 2010).

2.2.2 Chumbo

O chumbo (Pb) destaca-se dentre os metais porque a exposição aumentou exponencialmente se comparado com os níveis existentes antes da revolução industrial no início do século IX (Grandjean, 1983). A maior parte do chumbo utilizado pela indústria vem da exploração de minérios, da reciclagem

de fragmentos de metal ou baterias, e encontra-se ainda presente em baterias, tintas, produtos cerâmicos, calefação, soldas, gasolina de avião (Sinicropi et al., 2010). No entanto, a quantidade de emissão deste metal no ambiente faz com que o chumbo possa ser identificado em várias espécies de animais, além de uma enorme variedade de ambientes tais como atmosfera, águas de superfície, lençóis d'água, solo, sedimentos e aterros sanitários (Saryan e Zenz, 1994).

A absorção do chumbo acontece essencialmente pelas vias respiratórias e tróficas. Na população em geral a absorção gastrointestinal é a via mais comum, sendo mais elevada em crianças (40%) do que em adultos (5-15%) (Sinicropi et al., 2010). O chumbo possui uma lista razoável de alvos, como fígado, rins, pulmões, sistema imunológico e sistema nervoso central (Goyer, 1993). É conhecido por sua ação tóxica no sistema imunológico, exercendo efeitos deletérios em humanos e em outras espécies e é classificado pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) como 2A – provavelmente cancerígeno para humanos.

2.2.3 Mercúrio

O Mercúrio (Hg), assim como o cádmio, é um metal que não possui função fisiológica conhecida e seus efeitos sobre a biota são normalmente deletérios. Em vertebrados, esse metal pode afetar células especializadas muito importantes como células renais, neurônios e hepatócitos. Naturalmente proveniente da lixiviação das rochas contendo mercúrio ou da emissão de gases em áreas vulcânicas, as concentrações desse metal na atmosfera, hidrosfera, solo e biota têm aumentado muito em função das atividades antrópicas (Mason, 1991), que o utilizam na mineração, produção de compostos organomercuriais com ação bactericida e fungicida utilizados na agricultura e na indústria de tintas; síntese de reagentes, soluções desinfetantes e esterilizantes contendo mercúrio (Paasivirta, 1991), lâmpadas, termostatos, equipamentos médicos (barômetro, manômetro, termômetros), além de ainda ser bastante presente em formulações dentárias (amálgama) (Sinicropi et al., 2010).

Os vapores de mercúrio são incolores, inodoros, invisíveis e facilmente absorvidos pelos pulmões (cerca de 80%), constituindo a principal via de entrada do mercúrio no organismo. A via trófica é outra via de entrada e representa 5 –

10% da absorção, através do consumo de peixe contaminado principalmente pela forma organometálica do mercúrio (metilmercúrio) mas também por alguma quantidade de mercúrio inorgânico, que se acumula na cadeia alimentar através da biomagnificação. Assim, a concentração de mercúrio nos peixes predadores de topo de cadeia pode ser elevada, culminando, finalmente, na dieta dos humanos (Sinicropi et al., 2010).

Dentro da célula o mercúrio liga-se rapidamente à glutathione, presente na maioria das células em concentrações da ordem de mM. A glutathione não impede apenas que o Hg se ligue a proteínas alvo dentro das células, mas também serve como principal modo de eliminá-lo da célula (Patterson et al., 2004, Risher e De Rosa, 2007).

2.3 Modelo biológico

Os macrófagos são células de defesa, amplamente distribuídas pelo organismo, que recebem diferentes nomes de acordo com a sua localização. Alguns exemplos são: microglia no Sistema Nervoso Central, células de *Kupffer* no fígado, macrófagos alveolares no pulmão, células dendríticas nos linfonodos e células de *Langerhans* na pele. São células relativamente grandes, que medem entre 25-50 µm de diâmetro, apresentam núcleo irregular, possuem um ou mais nucléolos, cromatina pouco condensada, citoesqueleto bem desenvolvido, inúmeras projeções citoplasmáticas, grande número de lisossomos e mitocôndrias, e complexo de Golgi bem desenvolvido (Auger et al. 1992).

Eles são, sem dúvida, um dos mais importantes tipos de células do sistema imune inato (Halliwell et al., 1999) e podem exercer a função de defesa de maneira indireta, por meio de secreção de citocinas, da apresentação de antígenos (Klimp et al., 2002) ou de forma direta, identificando, fagocitando e destruindo efetivamente corpos estranhos. A fagocitose realizada pelos macrófagos compõe o início do conjunto das atividades biológicas de toda a resposta imunológica e da resposta inata, e é constituída pelas etapas de adesão ao substrato, quimiotaxia, ingestão de células e partículas inertes e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Sporn et al., 1990; De La Fuente et al., 1991; Aderem et al., 1999; Zapolska-Downar et al., 2000). Há "espraiamento" do macrófago, com alteração da forma (de arredondada para achatada), e

consequente aumento da área de contato da membrana plasmática com o material a ser fagocitado, e redistribuição das organelas citoplasmáticas. Durante a etapa de aderência ao substrato, ocorre a ativação de receptores para moléculas de adesão, como fibronectina, vitronectina e laminina, ocasionando rearranjo do citoesqueleto celular para que ocorra a fagocitose (Sampaio, 2005). Com a internalização do patógeno (que pode ser um microrganismo ou um corpo estranho, assim como uma nanopartícula), há a formação de uma vesícula na qual o agente agressor permanece confinado, e esta fica acessível aos endossomos (Swanson e Baer, 1995). Por meio de uma série de eventos de fusão, a membrana vesicular e o conteúdo do endossoma fusionam-se para formar o fagolisossoma. Funcionalmente, após ingestão da partícula e formação do fagolisossoma, ocorre o aumento do consumo de oxigênio e na geração de ROS. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é o principal radical produzido e a partir dele são gerados outros radicais poderosos na defesa do organismo, como o OH^{\bullet} e o NO, que combinados produzem peroxinitrito ($ONOO^-$) e também H_2O_2 , altamente ativos na eliminação de patógenos invasores, microrganismos e células infectadas, mas que em excesso pode lesionar células vizinhas, causando dano, além de defesa (Bauerle et al., 1996; Pithon-Curi, 1995). Sendo assim, células fagocíticas são de grande interesse para a obtenção de informações sobre a resposta produzida frente à presença de "agentes agressores".

Entretanto, a interação sistêmica em um organismo dificulta a interpretação dos resultados e por isso as culturas de células são muito empregadas como modelos biológicos por oferecem a vantagem da realização de estudos em condições bastante controladas. Isso permite os estudos das funções celulares, mecanismos de toxicidade, classificação da toxicidade relativa de contaminantes, além de estudos de interações entre contaminantes e ambiente físico (Segner, 1998). As linhagens celulares encontram-se entre os modelos de estudo mais importantes e aplicáveis, pois uma vez estabelecidas, representam um suprimento ilimitado de células homogêneas que podem ser criopreservadas por vários anos ou décadas (Bols et al., 2005), diminuindo o número de animais utilizados na experimentação e, por conseguinte, adequando-se às questões éticas.

Dentre as linhagens imortalizadas de macrófagos disponíveis, destaca-se a RAW 264.7, oriunda de células tumorais peritoneais induzidas por vírus

(*Abelson Leukemia Virus*) em camundongos (Raschke et al., 1978). Estas células são aderentes e apresentam alta taxa de fagocitose e de multiplicação. São viáveis para testes de toxicidade, pois apresentam metabolismo que mimetiza macrófagos de culturas primárias (Ramamoorthy e Tizard, 1998), bem como macrófagos humanos (Shavandi et al., 2011), porém não sofrem fase de declínio na proliferação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos da mistura de nanopartículas de prata e metais não essenciais na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar, por meio de estudo-piloto, a viabilidade celular, bem como a CL₅₀, das células quando expostas a diferentes concentrações dos contaminantes;
- Avaliar a citotoxicidade dos contaminantes testados através dos ensaios de exclusão do azul de tripan, MTT, Vermelho Neutro e Cristal Violeta;
- Mensurar o estresse oxidativo através da quantificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio;
- Verificar a atividade fagocítica através do ensaio de fagocitose com *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial com emprego da sonda JC-10 em citômetro de fluxo;
- Avaliar os focos de reparo de DNA por meio do ensaio com o anticorpo anti- γ -H₂AX;
- Determinar o tipo de morte celular e o tempo de ocorrência utilizando marcadores específicos para morte e microscopia confocal;
- Verificar a via de morte celular por meio de *Western blotting* e anticorpos anti-proteínas anti-apoptóticas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo da linhagem celular

A linhagem celular de macrófagos murinos, RAW 264.7 (Figura 2) foi obtida do banco de célula da ATCC, cultivada em meio de cultura *Dulbecco's Modified Medium* (DMEM) *high glucose* (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab), antibióticos (10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de estreptomicina e 10 U. ml^{-1} de penicilina, Gibco) e mantida em incubadora a 37 °C e 5% de CO_2 . Os subcultivos foram realizados a cada 3 – 4 dias, e a monocamada confluenta (70 - 80%) foi removida das garrafas de cultivo por tratamento com solução de tripsina-EDTA (0,25% tripsina, 0,02% de EDTA em PBS, pH 7,4). A suspensão celular foi centrifugada a 280 g, ressuspensa em meio de cultura e semeada na concentração de 5×10^5 - 1×10^6 células em novas garrafas de cultura de 25 cm^2 (Kasvi). Cada amostra de células retiradas do Nitrogênio Líquido foi utilizada para subcultivo durante o período de 12 passagens ou 1 mês.

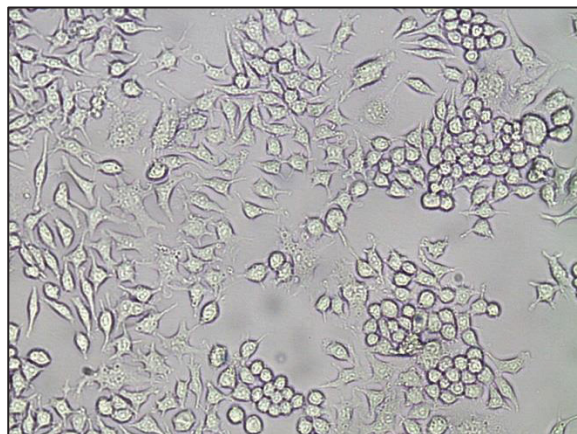


Figura 2. Linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 aderidas à garrafa

Fonte: A autora (2017)

4.2 Plaqueamento

Para os experimentos, 2.0×10^5 células. ml^{-1} foram semeadas. Em microplacas de 24 poços, 2.0×10^4 células eram colocadas no centro da lamínula, em uma gota cujo volume era de 100 μl e em placas de 96 poços, um volume de 100 μl /poço contendo 2.0×10^4 células era adicionado. As placas foram mantidas

em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h para adesão e recuperação das células.

4.3 Seleção da concentração de soro fetal bovino

Anteriormente aos procedimentos de exposição celular, realizou-se uma triagem para selecionar a menor concentração de soro fetal bovino que permitisse a adesão e sobrevivência das células, porém com proliferação mínima ou ausente. Essas condições se faziam necessárias para que houvesse uma interferência mínima do aumento de número de células nos ensaios realizados, além da interação indesejada das proteínas presentes no soro com as nanopartículas. Para isso, os ensaios de citotoxicidade (MTT, vermelho neutro e cristal violeta) foram realizados nas células cultivadas em placas de 96 poços, com meio DMEM suplementado com SFB a 0, 1, 2, 5 e 10% por 4, 24 e 48 h.

4.4 Síntese e caracterização das nanopartículas de prata

4.4.1 Síntese

A obtenção das nanopartículas de prata foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Arandi Ginane Bezerra Junior no Laboratório Fotonanobio, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, utilizando o método físico de ablação a laser em meio líquido. Este método consiste na focalização de um feixe de laser de alta potência na superfície de um alvo sólido imerso em solvente, como exibido na Figura 4, e apresenta como vantagem a dispensa da utilização de reagentes químicos que deixam resíduos nas nanopartículas.

A síntese foi realizada empregando um alvo de prata (99,99% de pureza) em 10 ml de água bidestilada estéril e o laser Nd:YAG laser (Quantronix, Model 117; 200 ns pulses @ 1064 nm, 3 mJ/pulse a 1.5 kHz). O laser focalizou o alvo metálico a 1 mm abaixo da superfície do líquido com fluência de 239 J/cm². O alvo foi movido aleatoriamente durante 10 min no plano de foco para obter condições de superfície idênticas, como representado pela Figura 3.

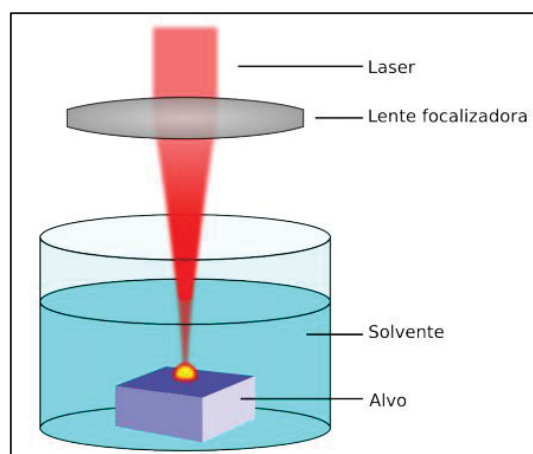


Figura 3. Método de ablação a laser utilizado para a síntese das nanopartículas de prata.
Fonte: Teixeira Rosa (2014).

Imediatamente após a síntese, as nanopartículas foram caracterizadas para o controle do processo, uma vez que o laser pode sofrer “interferências” externas, devido à variação de temperatura, corrente elétrica etc, e também para assegurar o mesmo padrão de tamanho e formato para os experimentos. As NPs-Ag foram caracterizadas por Espectroscopia Ultravioleta Visível, Espalhamento dinâmico de luz, Potencial Zeta e Microscopia Eletrônica de Transmissão, e a concentração de NPs-Ag na suspensão foi determinada por Espectrometria de Absorção Atômica de Chama.

4.4.2 Espectroscopia Ultravioleta-visível (UV-VIS)

Os espectros de absorção das amostras foram medidos por um espectrômetro *Ocean Optics USB2000+*, na faixa de 200 a 1050 nm, e resolução de 1 nm. Primeiramente foi medido o espectro da luz transmitida do solvente, no qual as partículas foram produzidas (água), em uma cubeta de quartzo para que este sinal seja utilizado como referência. Então, foi medido o espectro da luz transmitida através do coloide sob estudo e a quantidade de luz absorvida foi dada em termos da densidade óptica ou absorbância.

4.4.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O diâmetro medido com a técnica de DLS é chamado o diâmetro hidrodinâmico e refere-se ao modo como uma partícula difunde-se no interior de um fluido por meio do movimento browniano (Malvern, 2012).

Utilizando o DLS, os tamanhos das NPs-Ag foram medidos com *Microtrac Nanotrac Ultra NPA-252*.

4.4.4 Potencial zeta

O potencial das nanopartículas foi mensurado utilizando o *Zetasizer Nano® - Malvern* no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa em duas condições distintas: NPs-Ag dispersas em meio de cultura com SFB 2% (meio de exposição às células) na concentração utilizada durante a exposição e em água deionizada (meio em que as nanopartículas foram sintetizadas).

4.4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a análise em microscópio eletrônico de transmissão, uma gota da solução coloidal de NPs-Ag foi depositada em grades de cobre, anteriormente revestidas com uma fina película de carbono, e seca à temperatura ambiente. As imagens foram captadas pelo microscópio JEOL 1200EX-II, operando a 100 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica – UFPR.

4.4.6 Interferências com os reagentes/ensaios

A fim de verificar se as NPs-Ag poderiam interferir com os ensaios do MTT, níveis de espécies reativas de oxigênio e níveis de óxido nítrico, 50 µl de NPs-Ag e 50 µl dos reagentes 2X concentrados foram incubados, seguidos da leitura da absorbância e/ou fluorescência nos respectivos comprimentos de onda dos ensaios.

4.5 Seleção das concentrações de NPs-Ag, Cd, Pb e Hg

Devido à ausência de dados na literatura que relacionam NPs-Ag, Cd, Pb e Hg com macrófagos de mamíferos, ensaios de citotoxicidade (MTT e Vermelho Neutro) foram realizados para selecionar as concentrações dos contaminantes a serem utilizadas na fase seguinte desse trabalho.

As concentrações utilizadas no *screening* das NPs-Ag foram: 0; 0,15; 0,30; 0,60; 0,90; 1,20; 2,40; 3,60; 4,80; 6,20; 7,40 e 9,00 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, do CdCl_2 (Alfa Aesar) foram: 0; 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 75; 100; 150 e 200 μM , do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Aldrich) foram: 0; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 250; 500; 1000; 1500 e 2000 μM e do HgCl_2 (Puratronic) foram: 0; 0,1; 0,5; 0,75; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 20; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 600; 800; 1000 e 2000 μM .

4.6 Delineamento experimental

Baseado na CL_{50} de cada contaminante, foram selecionadas uma concentração que apresentou efeito claro, próximo ou igual a CL_{50} e outra concentração com efeito pouco pronunciado ou sem efeito (10x menor).

A exposição dos macrófagos aos contaminantes foi realizada através da substituição do meio de cultura por um novo meio suplementado com 2% de soro contendo os contaminantes isolados e/ou a mistura destes, como apresentado na tabela 1.

Foram escolhidos os tempos de exposição de 24 h para avaliar os efeitos produzidos pelos contaminantes quando os mecanismos de defesa já estariam esgotados e 4 h para verificar como mecanismos celulares adaptativos respondem frente à exposição.

Tabela 1. Grupos experimentais

Control	NP 0.36 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$	NP 3.6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$
Cd 1 μM	NP 0.36 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Cd 1 μM	NP 3.6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Cd 1 μM
Cd 10 μM	NP 0.36 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Cd 10 μM	NP 3.6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Cd 10 μM
Pb 25 μM	NP 0.36 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Pb 25 μM	NP 3.6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Pb 25 μM
Pb 250 μM	NP 0.36 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Pb 250 μM	NP 3.6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Pb 250 μM
Hg 15 μM	NP 0.36 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Hg 15 μM	NP 3.6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Hg 15 μM
Hg 150 μM	NP 0.36 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Hg 150 μM	NP 3.6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ + Hg 150 μM

NP - Nanopartículas de Prata; Cd – Cloreto de Cádmio;

4.7 Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade foi mensurada por ensaios que verificam diferentes condições da célula: integridade de membrana plasmática (azul de tripan), atividade de desidrogenases, particularmente da succinato desidrogenase mitocondrial (MTT), atividade/integridade lisossômica (Vermelho Neutro) coloração dos ácidos nucleicos (Cristal violeta).

4.7.1 Exclusão do Azul de tripan

Para esse ensaio, após o período de exposição (4h e 24h) aos contaminantes, o meio de cultura foi retirado da placa e 50 µl do corante azul de tripan (0,4%, Sigma®) foram adicionados aos poços da microplaca e após 1 min os poços foram lavados 1X com PBS. Em seguida a placa foi levada ao microscópio invertido e 3 - 4 imagens por poço foram capturadas (Glinski et al., 2016). A análise foi realizada a partir de 30 imagens por grupo experimental (10 imagens por experimento em três experimentos independentes), com um número mínimo de 100 células por imagem, classificadas em viáveis ou não viáveis.

4.7.2. MTT

Ao final do período da exposição aos contaminantes (4h e 24h), o meio de cultura foi retirado e foram adicionados a cada poço 200 µl de novo meio de cultura contendo a solução de MTT (Sigma - concentração final - 0,5 mg.ml⁻¹) e as microplacas permaneceram na incubadora por 2 h. Ao final desse período, todo o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS. Os cristais insolúveis de formazan foram dissolvidos em 100 µl de DMSO e a absorbância foi detectada em espectrofotômetro a 560 nm (Mosmann, 1983, com modificações).

4.7.3 Retenção do Vermelho Neutro

Ao final das 24h de exposição, as células foram incubadas em 200 µl de meio de cultura contendo 50 µg.ml⁻¹ de vermelho neutro (Sigma) a 37° C por 3 h. Decorrido esse tempo, os poços foram lavados três vezes com solução contendo formol (0,5% em água) e cloreto de cálcio (0,1%) para remoção do corante não incorporado e fixação das células. Em seguida, foram adicionados 300 µl de solução de ácido acético (1%) e etanol a 50% aos poços para extração do corante. Após 15 min, o conteúdo de cada poço foi homogeneizado para suspensão do corante. O conteúdo foi deixado em repouso por 5 min para a precipitação dos restos celulares e 200 µl do sobrenadante foram transferidos para outra microplaca para leitura em espectrofotômetro a 540 nm (Borenfreund e Puerner, 1985).

4.7.4 Cristal violeta

Para este ensaio, após 24 h de exposição das células, o sobrenadante foi removido, seguido de uma lavagem com PBS. As células aderidas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 min e 4 °C. Em seguida, a solução de cristal violeta (Merck - 0,25 mg/ml) foi adicionada para coloração por 10 min à temperatura ambiente. A solução foi aspirada e o excesso de corante foi removido por duas lavagens sucessivas com água destilada. Em seguida foi adicionado 100 µl de ácido acético 33% e levado a um agitador por 30 min para eluição do corante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm (Vega-Avila e Pugsley, 2011, com modificações).

4.8 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para detectar os níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) foi utilizado o marcador fluorescente diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), que se difunde passivamente nas células, é desacetilado (DCFH₂) e subsequentemente oxidado por EROs, originando 2'7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente (Hauglang, 1996; Benov et al., 1998). Embora este método quantifique principalmente o peróxido de hidrogênio, ele não é totalmente

específico para esta espécie reativa de oxigênio, podendo também quantificar o ânion superóxido.

Após o término do período de exposição (4h e 24h) aos contaminantes, o meio de cultura dos poços foi removido e 200 µl de meio de cultura contendo 10 µmoles.l⁻¹ de H₂DCFDA (Sigma) foi adicionado a cada poço. Passados 15 min de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e posteriormente foi adicionado em cada poço 200 µl de PBS para leitura em espectrofluorímetro (λ de excitação = 488 nm; λ de emissão = 530 nm).

Os níveis de EROs foram normalizados pela viabilidade celular obtida pelo método do azul de tripan, de forma a minimizar a interferência da redução da viabilidade de alguns grupos no ensaio.

4.9 Óxido Nítrico (NO)

Após o período de exposição aos contaminantes (4h e 24h), 150 µl do meio de reação (sobrenadante) foram transferidos para microplacas pretas e foram adicionados 10 µl de 2,3-diaminonaftaleno (DAN) a 0,05 mg.ml⁻¹ em HCl 0,62M (DAN - Sigma) a cada poço. Após 30 min de incubação em temperatura ambiente e protegida da luz, a reação foi interrompida por 5 µl de NaOH 2,8 M. A formação de 1-H-naftotriazol derivada da reação do nitrito com 2,3-diaminonaphthalene foi determinada com um espectrofluorímetro, com comprimento de onda de excitação 365 nm e comprimento de onda de emissão de 450 nm (Misko *et al.*, 1993, com pequenas modificações)

Os dados também foram normalizados pela viabilidade celular obtida pelo método do azul de tripan, de forma a minimizar a interferência da redução da viabilidade de alguns grupos sobre o ensaio.

4.10 Atividade fagocítica

As células foram cultivadas em lamínulas de 13 mm previamente inseridas em placas de 24 poços em uma concentração de 2,0 x 10⁴ por poço. Após 4h de exposição, uma suspensão de 2,0x10⁵ células.ml⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae* em meio DMEM sem soro foi adicionada a cada poço (~10 leveduras por macrófago) e incubadas por 2 h a 37°C. Então, as células foram lavadas duas

vezes em PBS, fixadas em etanol 95% por 1 h, coradas com Giemsa (Merck), e lâminas permanentes foram montadas com *Permunt*.

O número total de macrófagos, o número de macrófagos com leveduras internalizadas e o número de leveduras englobadas foi determinada sob microscópio de luz com lente objetiva de 40X, como mostra a Figura 4. Entre 25 - 100 células por campo de um total de 10 a 30 campos foram analisadas por grupo experimental. Os dados da contagem, de 0 a 16 leveduras por célula, foram convertidos para $\sqrt{(\text{número de leveduras}+1)}$ para comparações estatísticas.

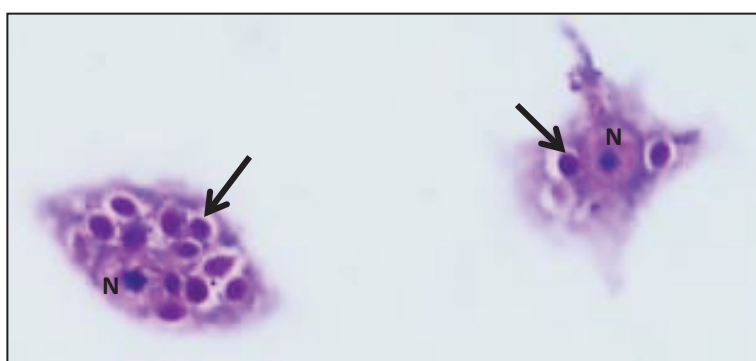


Figura 4. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* pelas células RAW 264.7. Na ponta da seta as leveduras fagocitadas apresentando “halo” característico do fagolisossomo. “N” indica o núcleo.

Fonte: A autora (2017)

4.11 Potencial de Membrana Mitocondrial

O Potencial de Membrana Mitocondrial (MMP) foi determinado utilizando *Mitochondria Membrane Potential Kit JC-10 Assay* para citometria de fluxo (Sigma) seguindo as instruções do fabricante. Esse reagente é catiônico e se acumula na mitocôndria de acordo com o potencial da membrana. Ele forma espontaneamente J-agregados com intensa fluorescência vermelha (excitação/emissão = 540/570 nm) em células com alto MMP. Em células apoptóticas ou não saudáveis, no entanto, a MMP colapsa e JC-10 permanece na forma monomérica, o qual gera apenas uma fluorescência verde (excitação / emissão = 485/535 nm).

Para o ensaio, as 5×10^5 células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² durante 24 h e expostas aos contaminantes por 4 h. As células foram desaderidas utilizando tripsina-EDTA, centrifugadas e incubadas com a sonda

por 30 min a 37°C. Após isto, foram centrifugadas novamente e ressuspendidas em tampão de ligação. Para esse ensaio apenas alguns grupos foram selecionados (controle negativo e 8 grupos) de acordo com os efeitos demonstrados em 4 h de exposição (aumento dos níveis de EROs e NO).

A aquisição de dados foi realizada após calibração do citômetro de fluxo com população de células sem marcação e com controle positivo de marcação. Em cada análise, 1×10^4 eventos foram considerados. Os dados foram obtidos no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando os detectores FL1 e FL2 e 4 experimentos independentes foram realizados. A diminuição do MMP foi indicada por um aumento da fluorescência no quadrante LR (verde). A porcentagem das células nos quadrantes foi calculada usando o *software Flowing* e normalizada pelo grupo controle para fins de comparação estatística.

4.12 Focos de reparo de DNA

As células foram cultivadas em lamínulas de 13 mm previamente inseridas em placas de 24 poços. Após 4 h exposição, as células foram lavadas em PBS (pH 7,4), fixadas em paraformaldeído a 4% durante 20 min, bloqueadas com glicina 0,1 M durante 10 min, lavadas duas vezes em PBS, bloqueadas com albumina a 1%, saponina a 0,01% em PBS durante 10 min e incubadas com o anticorpo primário anti fosfo-H₂AX (Sigma 1:1000, em albumina a 1%, saponina a 0,01% em PBS) durante 1 h, seguido por anticorpo secundário anti-coelho conjugado com TEXAS RED (1:200, Jackson Immuno Research Laboratories). As lamínulas foram montadas utilizando meio de montagem *Vectashield* com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole, Vector Laboratories), que cora o DNA, e as imagens foram adquiridas no microscópio confocal *Nikon A1RSiMP* (NIKON, Tokyo, Japão). O número de focos de reparo do DNA em cada núcleo foi contado e classificado em quatro categorias: 0 (sem foco), 1 (1-3 focos), 2 (4-10 focos) e 3 (≥ 11 focos). Os valores atribuídos a cada núcleo (0, 1, 2 e 3) foram convertidos para $\sqrt{(\text{valor}+1)}$ para comparações estatísticas.

4.13 Detecção Intracelular de NPs-Ag, Cd e Pb

As células (5×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de fundo de vidro (Greiner Bio-one #627870). Após 24 h de exposição, as células foram lavadas três vezes com NaCl 0,85%, e incubadas por 60 min a 37 °C, protegida da luz com as sondas Leadmium Green (Molecular Probes, Invitrogen - #A10024; específica para Cd e Pb intracelular, conforme instruções do fabricante), 75 nM de LysoTracker (Molecular Probes, Invitrogen - L-7528; específico para compartimentos ácidos) e 0,2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de Hoechst (específico para DNA).

As células foram lavadas duas vezes com solução salina e visualizadas em microscópio confocal *Nikon A1RSiMP* (NIKON, Tokyo, Japão). O *software NisElements* (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para ajustar os parâmetros de fluorescência das imagens.

4.14 Morte celular

A fim de verificar o tipo de morte celular e em quanto tempo de exposição isso ocorre, imagens em time-lapse foram capturadas para as células expostas às maiores concentrações dos contaminantes e misturas. As células (5×10^4 células / compartimento) foram cultivadas em placas de fundo de vidro (Greiner Bio-one #627870) e incubadas com Hoechst (0,2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (0,25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, BD Biosciences) em câmara de gás CO_2 , umidade e temperatura constante de 37 °C no microscópio de multiphoton confocal de varredura *Nikon A1RSiMP* (NIKON, Tóquio, Japão). As imagens foram capturadas a cada 15 min (a partir do momento da exposição) durante 24 h e o *Software NisElements 4.20* (NIKON, Tóquio, Japão) foi utilizado para a visualização das imagens e produção de vídeo.

Os dados acima foram corroborados por um experimento realizado em *High Content Imaging*, gentilmente disponibilizado pela empresa *Molecular Devices*, em placa de 96 poços (*Corning® 96 Well Flat ClearBottom Black Polystyrene TC-Treated Microplates*, Cat. #3603) após 24 h de exposição utilizando os mesmos marcadores fluorescentes. Foram obtidas 16 imagens por poço, em objetiva de 20X e as imagens foram processadas utilizando o *software MetaXpress®*.

4.15 Preparação dos lisados celulares e separação das proteínas

As células foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^6 células/poço), expostas aos contaminantes por 8 h, tempo necessário para início do processo de morte acontecer (vide item 5.11.2), ressuspensas em 500 µl de tampão de lise Low Ripa (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 1 mM fluoreto fenil-metil-sulfonila (PMSF) e coquetel inibidor de proteases (Sigma)) e congeladas/descongeladas por 3 vezes. O material foi centrifugado a 13000 g por 15 min a 4° C e o sobrenadante recolhido.

As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (1976), reduzidas e desnaturadas com tampão de amostra redutor (Tris-HCl 1 M pH 6,8, SDS 0,1%, Glicerol 10%, Azul de bromofenol 0,02% e β-mercapto-etanol 5%) e aquecidas a 100 °C por 5 min. Foram separadas de acordo com o tamanho através da corrida eletroforética em mini-gel de poliacrilamida a 4% (gel de empilhamento) e 8% (XIAP – MM = 57 kDa) e 12% (Bcl 2 – MM = 26 kDa) para separação, com aplicação de 30 µg de proteínas totais por poço do gel e campo elétrico vertical. Foi utilizado tampão de corrida para SDS-PAGE (Tris base 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1%) e a velocidade foi ajustada para 15 mA com voltagem variada. O marcador de massa molecular (Kaleidoscope – broad range - Biorad 1610324) foi utilizado para monitoramento do perfil eletroforético. Para a visualização das bandas formadas após a separação eletroforética, as proteínas foram coradas com solução contendo: 0,1% de *Comassie Brilliant Blue* (R250), 10% de ácido acético e 45% de metanol, permanecendo 30 min no *biomixer*. O gel foi lavado com *DESTAIN* (metanol a 50% + ácido acético glacial a 15%) com sucessivas trocas para retirar o excesso de corante.

4.16 Western Blotting

As proteínas do gel de poliacrilamida separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad®, poro de 0,45 µm) em uma cuba contendo tampão de transferência (Tris-base a 25 mM, Glicina a 192 mM, SDS a 0,037% e metanol a 20%). A velocidade da corrida foi ajustada para 100 V, com amperagem variada, durante 60 min a 0 °C. Em seguida, a membrana foi bloqueada com leite sem gordura 5% (Molico) em solução de TBS-T (20 mM de Tris, pH 7.4, 120 mM de NaCl e 0.05% de Tween 20) sob agitação em temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com

os anticorpos primários anti-Bcl2 (1:500) e anti-XIAP (1:250) do Apoptosis I Sampler Kit (BD-612741) sob agitação constante *overnight* a 4° C. Então, a membrana foi lavada com TBST 3 vezes por 5 min para a remoção dos anticorpos primários não ligados e foi incubada com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de camundongo conjugada à peroxidase (Sigma) por 1 h em uma diluição de 1:2000. As proteínas puderam ser visualizadas através de um substrato quimioluminescente (Pierce ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) sobre a membrana exposta a um filme de raio-X sensível (Amersham Bioscience) em um intervalo de até 20 min. Para detecção do padrão interno, foi utilizado o anticorpo primário anti- α -tubulina (Santa Cruz - diluição 1:2000).

4.17 Análises estatísticas

Ao menos três experimentos independentes foram realizados para os ensaios quantitativos. Os dados foram testados quanto à normalidade (D'Agostino & Pearson omnibus) e analisados através de ANOVA uma via (dados com distribuição normal) ou *Kruskal-Wallis* (dados sem distribuição normal). Foram realizados os pós testes de *Dunnett* ou *Dunns* (quando apropriado). As seguintes comparações foram realizadas: controle *versus* grupos isolados de exposição e controle *versus* grupos de mistura (efeito em comparação com o controle) e cada grupo de mistura *versus* contaminantes individuais presentes naquela mistura particular (efeito de interação de ambos os contaminantes). Um valor de $p < 0,05$ foi assumido como estatisticamente significativo.

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.1 Síntese e caracterização das NPs-Ag

A suspensão de NPs-Ag apresentou uma coloração “marrom-amarelada” logo nos primeiros minutos de ablação e permaneceu com as mesmas características (ausência de precipitados e/ou agregados) por mais de 6 meses após a síntese, como apresentado na figura 5.



Figura 5. Aspecto da suspensão de NPs-Ag
Fonte: A autora (2017)

5.1.1 UV-VIS

A análise por UV-VIS é realizada com base nos valores de absorbância máxima ($A_{\text{máx}}$), comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) e largura a meia-altura (FWHH, do inglês *full width at half-height*), como exemplificado na Figura 6. O valor de $A_{\text{máx}}$ está relacionado ao número de partículas formadas e FWHH nos dá uma ideia da polidispersidade (Link e El-Sayed, 1999). Já λ_{Max} está relacionado ao tamanho das NPs, sendo que se observa um deslocamento para o vermelho deste valor com o aumento no tamanho das NPs (Jain et al., 2008).

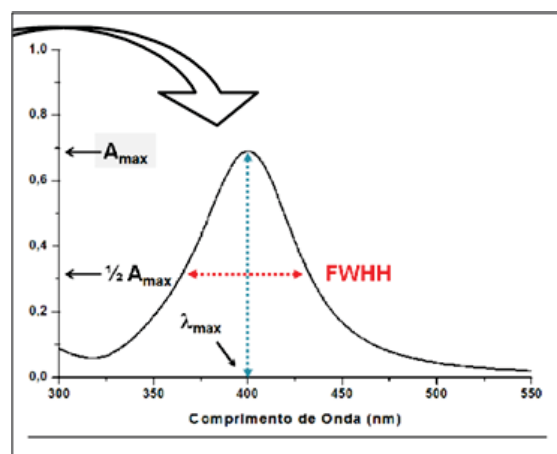


Figura 6. Banda SPR típica de NPs-Ag esféricas
Fonte: Signori (2010).

A suspensão foi submetida, logo após sua síntese, à leitura no equipamento UV-VIS e apresentou um pico de absorção em 400 nm, característico da NPs-Ag, como pode ser visto na Figura 7. Além disso, as NPs-Ag coloidais também apresentaram uma coloração marrom amarelada típica, que corresponde ao espectro resultante da absorção de fótons com comprimento de onda em torno de 400 nm.

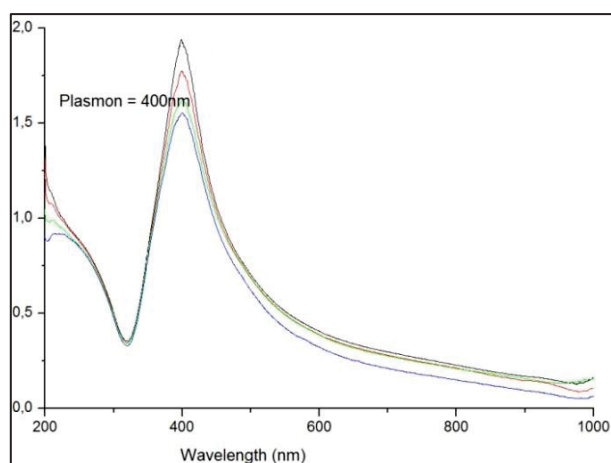


Figura 7. Espectro de absorção UV/Vis da amostra de NPs-Ag em água. As diferentes cores demonstram diferentes amostras apresentando o mesmo pico em 400 nm.
Fonte: A autora (2017)

Nanopartículas metálicas, como as NPs-Ag, apresentam propriedades ópticas interessantes, caracterizadas por uma ressonância devida a uma oscilação coletiva de elétrons de superfície, decorrente da alta razão superfície/volume. Este efeito, conhecido como ressonância de plasma pode ser

visto por uma forte absorção na região do visível. O comprimento de onda da banda é fortemente dependente de fatores como tamanho e forma das NPs, bem como do meio em que estas se encontram. Por isso, a espectroscopia UV-Vis tem sido muito utilizada para se obter informações qualitativas a respeito da distribuição de tamanho das NPs através do valor máximo da banda e também da largura à meia altura desta banda (Castro, 2009).

5.1.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz (DLS – do inglês *Dynamic light scattering*) é utilizado para avaliar a distribuição da população de tamanhos de partículas suspensas em meio líquido (Berne e Pecora, 2000). Em técnicas baseadas na luz difundida, é empregado um feixe de raio laser que entra em contato com as partículas em um fluido e o resultado da luz difundida fornece os dados da distribuição dos tamanhos das partículas. O princípio empregado é de que quando uma partícula atravessa um feixe de laser, um espalhamento de luz em ângulo acontece, e este é inversamente proporcional ao seu tamanho (Machado, 2012). Essa observação foi primeiramente realizada por Gustav Mie, através da resolução das equações de Maxwell para sistemas nanométricos, utilizando condições de contorno adequadas e supondo partículas esféricas, ele deduziu que essa dispersão é dependente do diâmetro das partículas presentes no sistema (Pereira, 2009; Filho, 2008). Esta técnica fornece detalhadamente a distribuição das populações de tamanhos das nanopartículas sintetizadas e gera histogramas dessas distribuições, como pode observado na Figura 8.

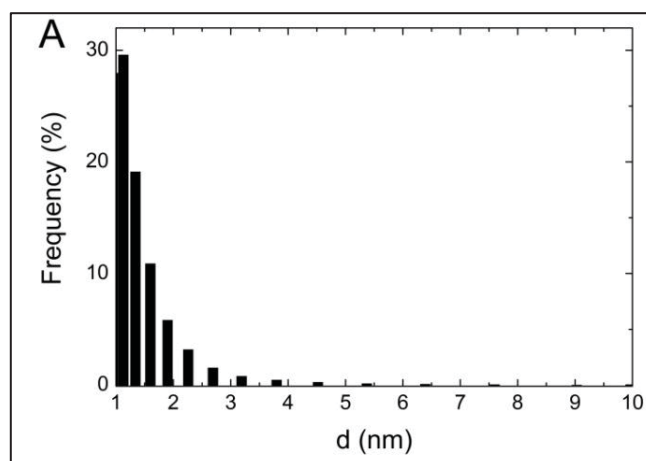


Figura 8. DLS da suspensão de NPs-Ag. Partículas com tamanho entre 1 e 4 nm.
Fonte: A autora (2017)

A suspensão de NPs-Ag apresentou uma estreita distribuição de tamanho, com prevalência entre 1-2 nm, chegando até a 4 nm, equivalente a 95% da amostra

Esse tamanho reduzido justifica a toxicidade das partículas. Para Lim et al. (2012) o tamanho das nanopartículas foi considerado um dos fatores mais importantes que influenciam a toxicidade e as interações com sistemas biológicos, além da sua composição, estrutura, forma e revestimento da superfície. Carlson et al. (2008) descobriram que NPs-Ag com 15 nm podem gerar mais EROs em comparação com NPs-Ag de 55 nm em macrófagos. Usando quatro linhagens de células (A549, HepG2, MCF-7, SGC-7901), Liu et al., (2010) descobriram que NPs-Ag de 5 nm foram mais tóxicas do que 20 e 50 nm. Wang et al. (2014) observaram que NPs-Ag de 20 nm mostraram mais citotoxicidade do que NPs-Ag de 110 nm e gerou adicionalmente inflamação neutrofílica aguda nos pulmões de camundongos.

A agregação das nanopartículas é um grande empecilho, normalmente, dificultando a interpretação dos resultados. Entretanto, as nanopartículas utilizadas mantiveram-se estáveis por um período mínimo de 6 meses (adotado como período máximo para utilização nos ensaios) ou com uma pequena taxa de agregação que não compromete os ensaios uma vez que se mantiveram menores que 5 nm (Figura 9).

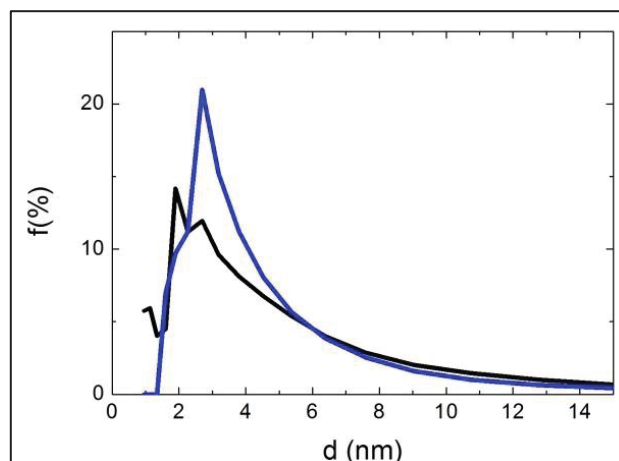


Figura 9. DLS da mesma amostra de NPs-Ag. Em preto: análise de tamanho imediatamente após a síntese; em azul: análise de tamanho 6 meses após a síntese.

Fonte: A autora (2017)

5.1.3. Potencial Zeta

O Potencial Zeta é uma medida da magnitude da repulsão, atração eletrostática ou cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade de uma suspensão. Seu valor pode ser relacionado à estabilidade de suspensões indicando o grau de repulsão entre partículas adjacentes e similarmente carregadas em uma dispersão. Para partículas pequenas, um Potencial Zeta alto conferirá estabilidade, o que significa que a suspensão resistirá à agregação. Quando o Potencial é baixo, a atração excede a repulsão e a suspensão floculará. Em geral, o limite que divide as suspensões em estáveis e instáveis é marcada em +30 mV e -30 mV, assim partículas com Potencial positivo superior a +30 mV ou Potencial negativo inferior a -30 mV são normalmente consideradas estáveis.

As medidas de Potencial Zeta de diversas amostras apresentaram valor médio de -26,4 mV para NPs-Ag suspensas em água. Este valor indica que as NPs-Ag estavam estáveis ou com pequena tendência a agregação em meio aquoso, uma vez que o valor esteve próximo do limite (-30 mV) considerado como estável. Para as amostras suspensas em meio de cultura celular, o valor médio do Potencial Zeta foi de -7,45 mV (Figura 10).

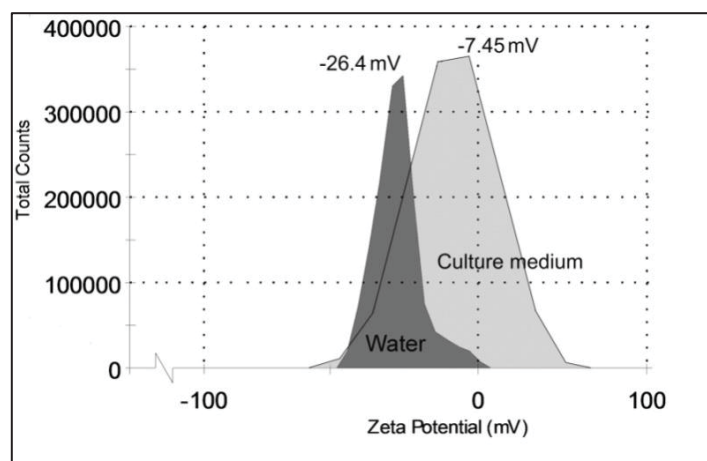


Figura 10. Potencial Zeta das NPs-Ag em água e em meio de cultura.
Fonte: A autora (2017)

Essa diminuição de Potencial Zeta em meio de cultura celular pode estar relacionada com a presença de íons e eletrólitos no meio, que influenciam na medição, além da adsorção de biomoléculas como proteínas do soro fetal bovino na superfície da nanopartícula. A aquisição de cargas na superfície da partícula acontece com a maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso, principalmente por ionização de grupos ou adsorção de espécies carregadas. Consequentemente, as cargas da superfície modificam a distribuição dos íons na interface, resultando em uma camada ao redor da partícula diferente da solução.

5.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises das imagens de MET corroboram o resultado apresentado no tópico 5.1.2. Observou-se em sua maioria nanopartículas esféricas e com diâmetro aproximado de 1 a 3 nm (Figura 11).

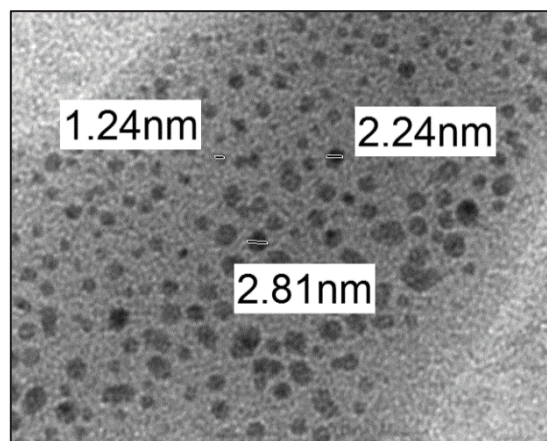


Figura 11. MET de uma amostra de NPs-Ag. Partículas com tamanho entre 1 e 3 nm
Fonte: A autora (2017)

A caracterização das nanopartículas assim como a análise de seu tamanho se faz imprescindível em todo estudo que avalia seus efeitos biológicos uma vez que a citotoxicidade e genotoxicidade são influenciadas pela variação de tamanho das partículas (Gliga, 2014). Além disso, a relação volume x área de superfície e a reatividade da superfície também pode ser alteradas em virtude do tamanho da partícula (Carlson, 2008; Chen e Zhang, 2012; Brito, 2014).

5.1.5 Interferências com os reagentes/ensaios

Nos testes de interferência das NPs-Ag com os reagentes dos ensaios não verificamos influência na absorbância ou fluorescência dos ensaios (dados não mostrados), diferente de estudos recentes (Ahmed et al., 2017) que afirmam que as nanopartículas interferem no resultado final do ensaio. No entanto, Kumar et al (2015) demonstraram que o tamanho das NPs-Ag tem relação direta com esta influência. Em seu trabalho, NPs-Ag de 100nm interferiram mais no resultado final do ensaio de MTT em relação à NPs-Ag de 10nm. Sabendo disso, adotamos a inexistência de tais interferências ao diminuto tamanho das NPs-Ag utilizadas nesse trabalho.

5.2 Seleção da concentração de soro

A fim de reduzir a proliferação celular durante as 24h de exposição aos contaminantes, fato esse que poderia mascarar os resultados de citotoxicidade,

testamos diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino (0, 1, 2 e 5%) e comparamos com a concentração de 10% de SFB, adotada como padrão para cultivo celular.

A diminuição da produção de cristais de formazam ocorreu após 4 h na presença de SFB a 2% e entre 24-48 h com 5% de SFB. A retenção de vermelho neutro não foi afetada após 4 h de cultura, mas aumentou após 24 h sem SFB e diminuiu após 48 h com 5% de SFB. No ensaio do Cristal Violeta, o número de células diminuiu após 4 h, continuando até 48 h na ausência de SFB. Na presença de SFB a 1%, o número de células diminuiu após 24 h; e na presença de SFB a 2%, uma diminuição no número de células foi encontrada após 4 h e 48 h (Figura 12). Diante desses resultados, a concentração de 2% foi eleita para ser utilizada durante o período de exposição, uma vez que os testes de MTT e cristal violeta diminuíram, indicando uma diminuição da proliferação celular, mas a retenção de vermelho neutro não foi afetada, indicando que a viabilidade celular não foi afetada. Ademais, a diminuição dos fatores presente no SFB parece mais adequada à abordagem toxicológica, uma vez que diminui a interferência na disponibilidade dos poluentes, já relatado por Liebel et al. (2015) e em especial na estabilidade e disponibilidade das NPs-Ag que sofrem grande influência do meio que estão dispersas como demonstrado por Krystek et al. (2015).

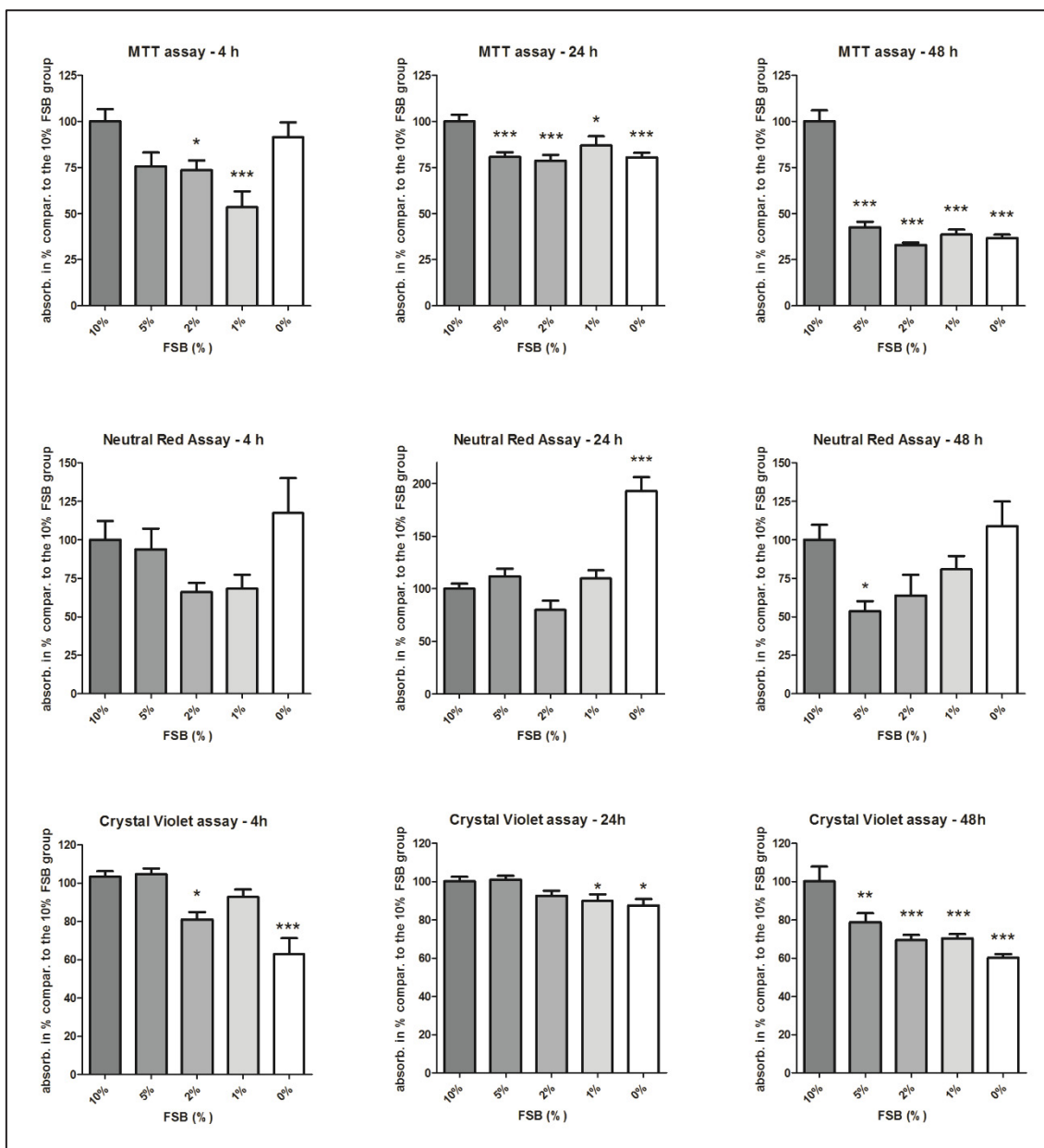


Figura 12. Citotoxicidade (MTT e Vermelho Neutro e Cristal violeta) após 4h, 24h e 48h de cultivo, com diferentes concentrações de SFB. Média \pm erro padrão da média. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo cultivado com 10% de SFB. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Fonte: A autora (2017)

5.3 Seleção da concentração dos contaminantes

5.3.1 Nanopartículas de prata

De acordo com o ensaio de MTT, a citotoxicidade aumentou significativamente a partir de $0,3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de NPs-Ag, e apresentou como CL_{50} concentrações $\approx 4.8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Figura 13). Shavandi et al. (2011) encontraram para

NPs-Ag de 18 - 34 nm a CL_{50} de $4 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para macrófagos peritoneais de camundongo. Park (2011) também demonstrou na linhagem celular de macrófagos U937, que as NPs-Ag de 5 nm apresentam citotoxicidade em concentrações entre $3,125$ e $6,25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e partículas de 100 nm provocaram citotoxicidade apenas em concentrações acima de $25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Em outro trabalho, utilizando NPs-Ag de 70 nm, mesmo em uma concentração de $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ não houve respostas citotóxicas. Isso indica que a entrada de nanopartículas menores na célula seja mais fácil em comparação com partículas maiores (Park, 2011).

A partir dos dados do ensaio de MTT, as concentrações $0,36 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e $3,6 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ foram selecionadas, respectivamente, como *não tóxica* ou *pouco tóxica* e *tóxica* para os ensaios seguintes. O ensaio de Retenção do Vermelho Neutro demonstrou ser para esse tipo celular um teste menos sensível e não foi utilizado para a escolha das concentrações dos contaminantes.

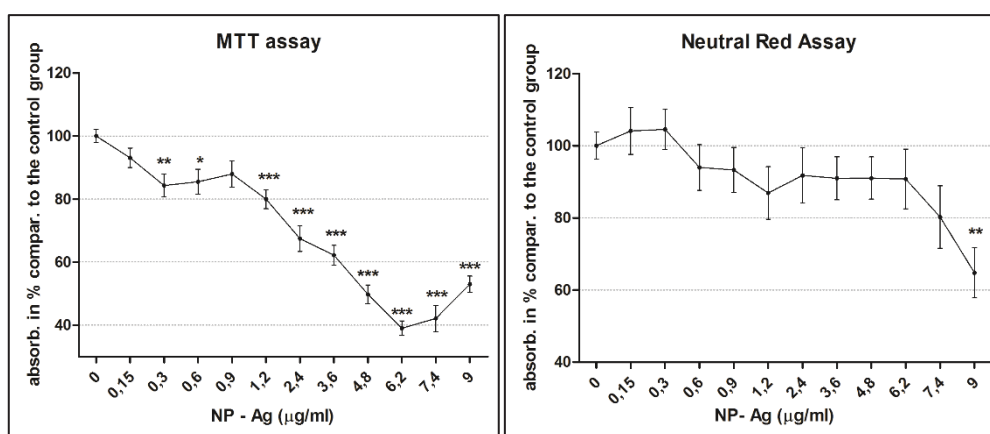


Figura 13. *Screening* das concentrações de Nanopartículas de Prata após 24 h de exposição, através dos ensaios de citotoxicidade (MTT e Vermelho Neutro) para selecionar as concentrações utilizadas no presente estudo. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (concentração "0"). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: A autora (2017)

5.3.2 Cloreto de Cádmio

O screening de concentração para CdCl_2 demonstrou que a concentração de $1 \mu\text{M}$ não foi citotóxica, provavelmente devido a um eficiente "tamponamento" do metal por metalotioneínas presentes na célula e induzidas pelo metal. As metalotioneínas são uma classe de proteínas intra-celulares não-enzimáticas amplamente conhecidas pela sua capacidade de ligação ao Cádmio

(Gerson e Shaikh, 1982) e outros metais bivalentes (Chen et al., 2014) tendo como uma de suas principais funções a detoxificação de metais pesados e outros agentes potencialmente danosos, como radicais livres (Vignesh e Deepe Jr, 2017). Bucio et al. (1995) demonstraram que 0,5 – 1,5 μM de CdCl_2 induziram aumento da concentração de metalotioneínas em células hepáticas fetais. Entretanto, em concentrações superiores a 2 μM de CdCl_2 houve uma redução abrupta do número de metalotioneínas.

No presente trabalho, de acordo com o ensaio do MTT, encontramos a $\text{CL}_{50} \approx 10 \mu\text{M}$ (Figura 14) e por isso, as concentrações escolhidas para os ensaios seguintes foram 1 μM e 10 μM .

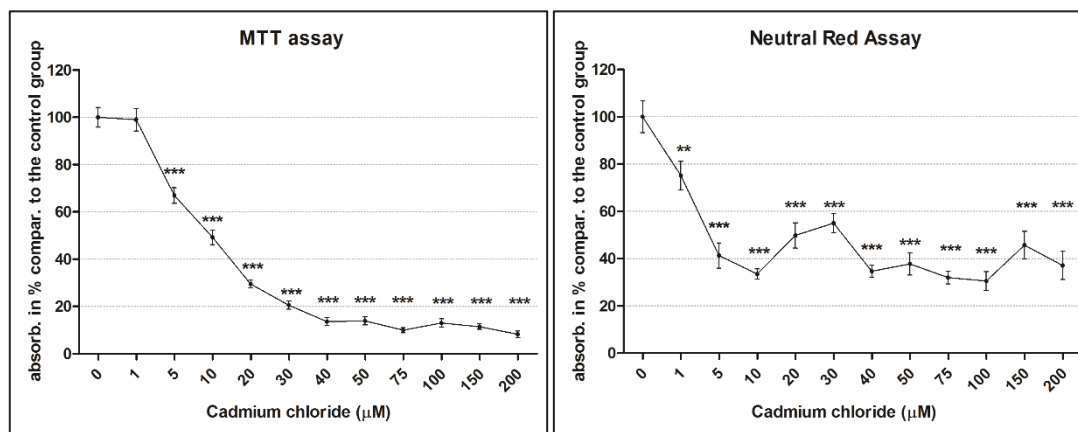


Figura 14. Screening das concentrações de Cloreto de Cádmio após 24 h de exposição, através dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro para selecionar as concentrações utilizadas no presente estudo. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (concentração "0"). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: A autora (2017)

5.3.3 Nitrato de Chumbo

A primeira concentração que apresentou diminuição de viabilidade significativa em relação ao grupo controle, no ensaio de MTT, foi de 250 μM (Figure 15). Por isso, essa concentração foi eleita como a concentração que apresentou efeito a ser utilizada nos ensaios futuros e 25 μM foi eleita a como a concentração sem efeito/ com baixo efeito aparente.

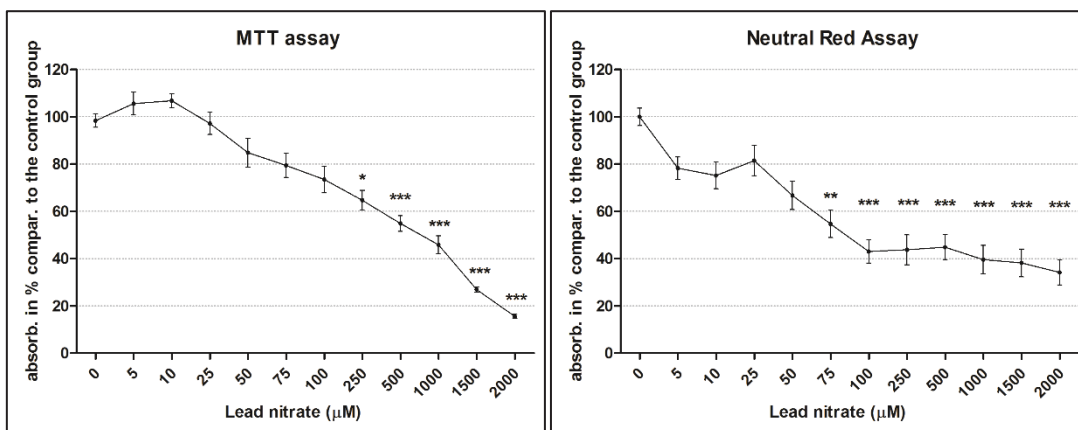


Figura 15. Screening das concentrações de Nitrato de Chumbo após 24 h de exposição, através dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro para selecionar as concentrações utilizadas no presente estudo. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (concentração “0”). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: A autora (2017)

5.3.4 Cloreto de Mercúrio

De acordo com os resultados obtidos em ambos os ensaios, o HgCl_2 demonstrou ser “tamponado” por mecanismos celulares. O Hg é muito eletrofílico e possui grande afinidade por grupamentos sulfidríla (nucleófilos), (Fabbri et al., 2012; Syversen e Kaur, 2012), como os presentes nas moléculas de glutatona e metalotioneína. Assim, é esperado que estas moléculas capturem ou reajam com o Hg, impedindo a interação do Hg com outros alvos celulares e, desta forma, reduzindo o efeito tóxico do Hg (Liu et al., 1995; Who, 1992).

A formação de formazan permaneceu quase constante até mesmo em altas concentrações, e caiu bruscamente para quase 0%, no ensaio de MTT, após atravessar o limiar de 200 μM . Aparentemente esta foi a concentração de Hg necessária para causar depleção do sistema de defesa celular. Tendo isso em vista, a concentração tóxica escolhida foi 150 μM por ultrapassar o limite do tamponamento e diminuir a viabilidade significativamente. A outra concentração escolhida, foi 10X menos que esta (15 μM), esperando pequeno efeito, como pode ser observado na Figura 16.

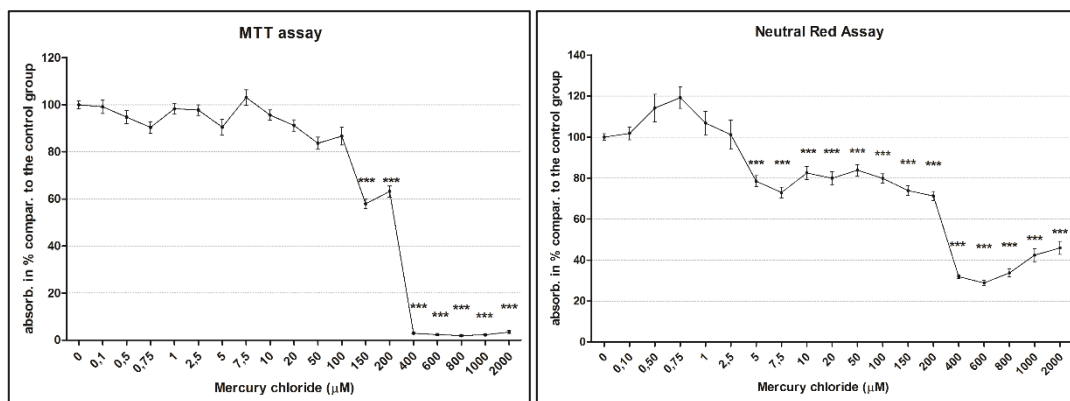


Figura 16. Screening das concentrações de Cloreto de Mercúrio após 24 h de exposição, através dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro para selecionar as concentrações utilizadas no presente estudo. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (concentração "0"). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: A autora (2017)

5.4 Ensaios de citotoxicidade

5.4.1 Exclusão do Azul de tripan

Não houve diferença na viabilidade celular após 4 h de exposição aos contaminantes (dados não apresentados).

Após 24 h, a diminuição da viabilidade celular ocorreu após a exposição 10 μM de Cd (47%), 250 μM de Pb (11%) e todas as misturas contendo NP + Cd (variando de 9 a 92%) e NP + Pb (variando de 11 a 16%). A interação ocorreu para Cd (3/4 grupos), Pb (1/4 grupos) e Hg (1/4 grupos), sendo o grupo NP 3.6 + Cd 10 com resultado mais expressivo com a viabilidade reduzida a 9%, como pode ser visto na figura 17.

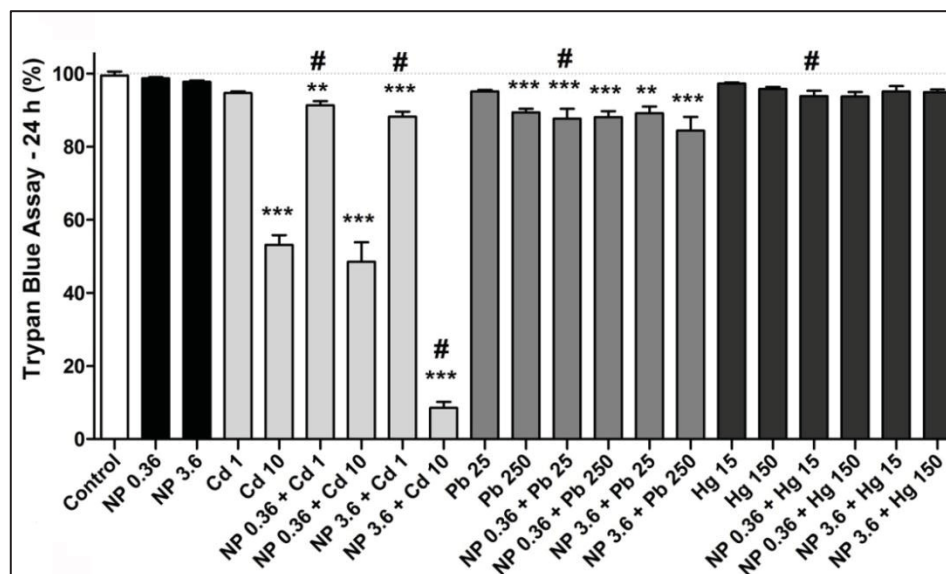


Figura 17. Citotoxicidade pelo ensaio de exclusão do Azul de Tripán após 24 h de exposição. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativa em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). O símbolo # indica interação (diferença significativa entre a mistura e os contaminantes isolados) ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média + erro padrão de três experimentos independentes. Concentrações: AgNP em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM .

Fonte: A autora (2017)

A figura 18 exibe de forma ilustrativa o efeito pronunciado da mistura NP 3.6 + Cd 10 apresentado na figura 18. Notou-se que o grupo controle apresentou células com morfologia e confluência características. No grupo NP 3.6 é possível notar que as células apresentaram vacúolos e possuem conteúdo intracelular de cor marrom, resultado da endocitose das NPs-Ag. No grupo Cd 10 há uma diminuição aparente no número de células. Isso aconteceu devido à morte das células que ocupavam aquele local da placa ao longo da exposição, e sua posterior fagocitose pelas demais células viáveis ao redor. Esta hipótese pode ser corroborada no ensaio de morte celular, descrito no item 5.11.2, que demonstrou que as células morrem por apoptose e não se soltam completamente do fundo da placa. O mesmo acontece no grupo NP 3.6 + Cd 10 que apresentou um número ainda menor de células no campo e as que restaram encontraram-se coradas pelo tripan.

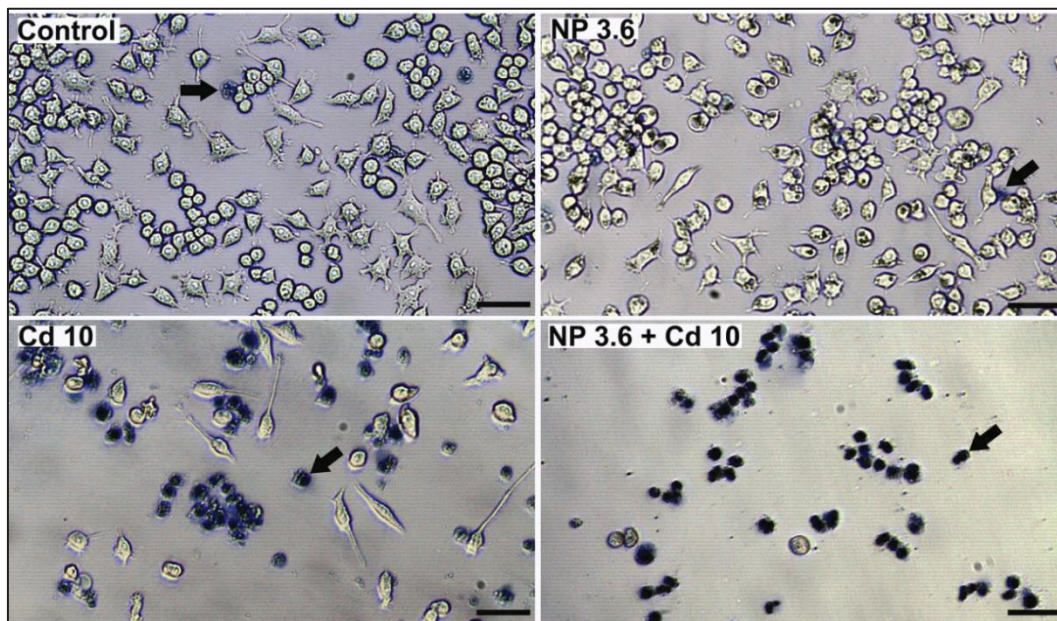


Figura 18. Aspecto visual da citotoxicidade pelo ensaio de exclusão do Azul de Tripán após 24 h de exposição. Células viáveis – células claras. Células inviáveis - células coradas em azul (indicadas pela seta). Interação evidente em NP 3.6 + Cd 10. Concentrações: NP-Ag em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM . Barra: 50 μm .

Fonte: A autora (2017)

O método utilizado é bastante seguro para esse tipo celular, uma vez que as células são individualizadas e não formam grumos; Não houve desadesão das células mortas e a possibilidade de visualizar a célula corada, aderida no poço da microplaca foi importante no momento da análise. Além disso, devido ao caráter visual e manual de quantificação, foram diminuídas as variáveis que são comuns em outros métodos quantitativos.

Esse método utilizou como princípio a exclusão do corante vital azul de tripán (Phillips, 1973). O corante penetra no interior de células que perderam a integridade da membrana plasmática. Assim, é possível detectar células não viáveis, cuja membrana, por apresentar danos, permite a incorporação do corante, corando-se de azul. Por outro lado, como a integridade da membrana é pré-requisito para viabilidade celular, as células viáveis não são coradas (Ribeiro et al., 2003). Todavia, sabe-se que a membrana plasmática só perde sua integridade nos estágios finais da apoptose ou se sofrer o processo de necrose. Portanto, a limitação deste ensaio foi não detectar células que estejam no estágio inicial de apoptose ou células que tenham rompido completamente. Por esse motivo, realizamos o teste de morte celular usando marcadores fluorescentes

específicos para identificar e diferenciar o número de células que não são viáveis em estágio inicial ou final de apoptose, mostrado em 5.11.

5.4.2 MTT

Este ensaio se baseia na capacidade de células viáveis e metabolicamente ativas reduzirem enzimaticamente o MTT (3 - [4, 5-dimetil-2-il]-2, brometo de 5-difenil tetrazólio) a sais de formazam de cor púrpura que podem ser quantificados por espectrofotometria após diluição com DMSO (Reilly et al., 1998). Sendo as desidrogenases mitocondriais as principais responsáveis pela reação de redução, para que esta reação ocorra há a necessidade de que a célula esteja viável e suas mitocôndrias funcionais.

Pela análise do MTT, o aumento da atividade das desidrogenases ocorreu com 4 h de exposição à NPs-Ag (variando de 25 até 35%), aos 3 metais (variando de 20 até 30%) e a maioria das misturas de NP + Pb (3/4 Grupos) e NP + Hg (4/4 grupos). Com relação às associações dos contaminantes, os grupos NP 0.36 + Cd1, NP 0.36 + Cd10 apresentaram diminuição significativa em relação à exposição aos contaminantes isolados, evidenciando que as mitocôndrias sofrem os efeitos da mistura logo nas primeiras horas de exposição. Os grupos NP 3.6 + Pb 250 e NP 3.6 + Hg 15 tiveram aumento da atividade das desidrogenases em relação aos grupos expostos de forma isolada (Figura 19A).

Em 24 h, observou-se uma mudança no padrão de resposta. A citotoxicidade foi evidente, com diminuição da atividade das desidrogenases após exposição a todos os grupos de contaminantes, com exceção de Hg. Com relação às associações, os grupos NP 3.6 + Cd 10 e NP 3.6 + Pb 25 apresentaram diferença significativa em relação ao seus contaminantes isolados, evidenciando que os efeitos das associações podem ser mais deletérios às células, do ponto de vista mitocondrial (Figura 19B). A perturbação da atividade mitocondrial foi relatada para Cd^{2+} (Yano e Marcondes, 2005; Murugavel et al., 2007; Shao et al., 2014;) e AgNP (Piao et al., 2011; Shavandi et al., 2011, Teodoro et al., 2011), confirmando o achado atual. Também Pb^{2+} (Korashy e El-Kadi, 2004) e Hg^{2+} (Vergilio et al., 2015) podem ter a toxicidade explicada por distúrbios mitocondriais. Em geral, os mecanismos podem variar

de desacoplamento direto do transporte de elétrons e fosforilação oxidativa até aumentos de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO).

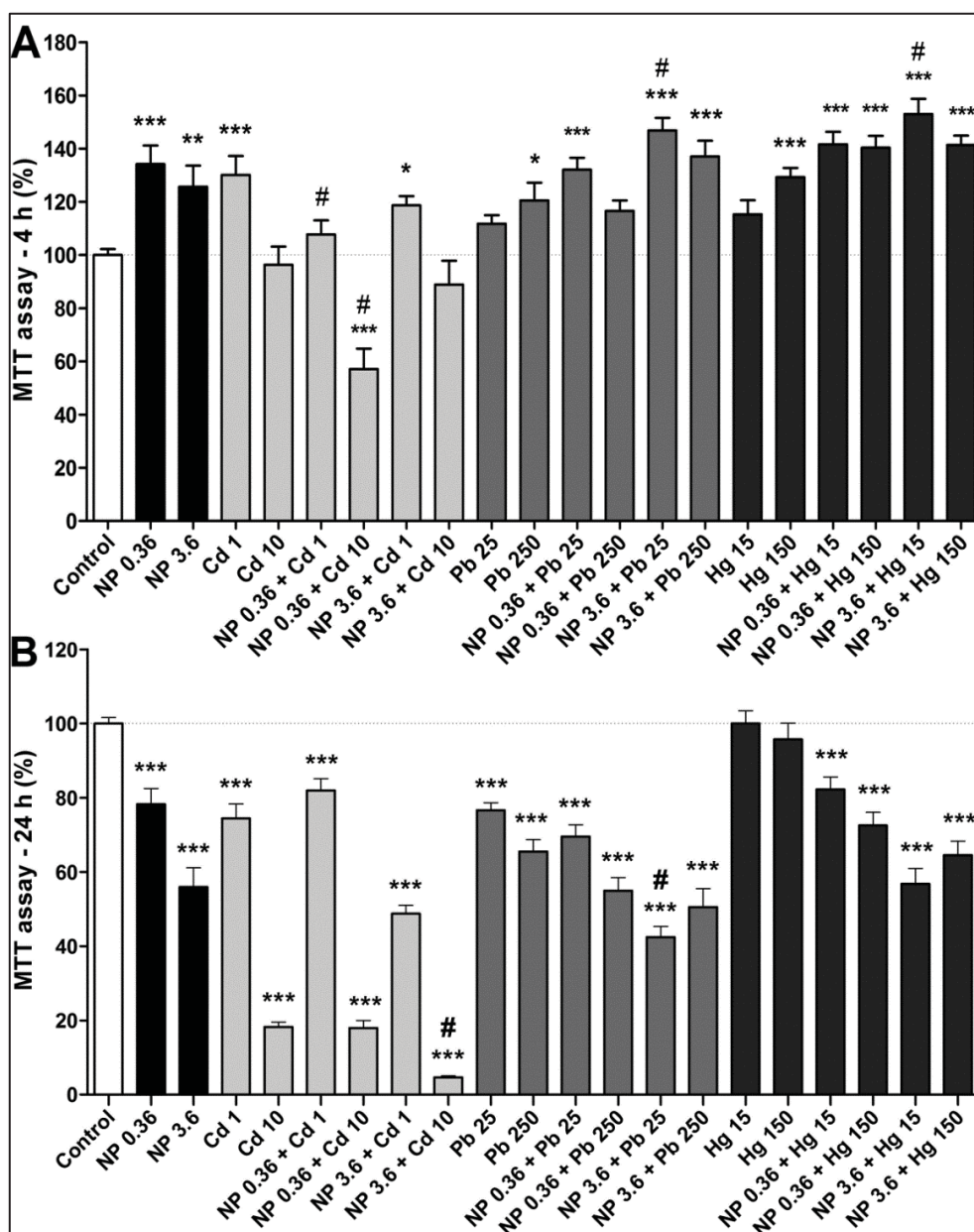


Figura 19. Citotoxicidade pelo ensaio de MTT após 4 h e 24 h de exposição. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativa em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). O símbolo # indica interação (diferença significativa entre a mistura e os contaminantes isolados) ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média + erro padrão de três experimentos independentes. Concentrações: AgNP em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM .

Fonte: A autora (2017)

5.4.3 Retenção do Vermelho Neutro

O ensaio de vermelho neutro é uma análise colorimétrica para quantificação de permeabilidade de membrana e atividade lisossômica de células em resposta a compostos estranhos. Esse ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis de incorporar e assimilar o vermelho neutro dentro dos lisossomos. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco, que penetra prontamente nas membranas e é acumulado intracelularmente nos lisossomos (meio mais ácido no lisossomo), onde se combina com a parte aniônica da matriz lisossômica (Svendsen et al., 2004). Mudanças na superfície celular ou membrana lisossômica levam à fragilidade lisossômica e outras mudanças que se tornam gradativamente irreversíveis. Tais alterações ocorridas pela ação de xenobióticos resultam na diminuição na retenção do Vermelho Neutro. A quantidade de corante incorporado às células é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta.

A retenção do vermelho neutro foi reduzida em células expostas a 3,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de NPs-Ag (20%), aos 3 metais (variando de 12 até 34%), a nas misturas de NP + Cd (4/4 grupos), NP + Pb (3/4 grupos) e NP + Hg (2/4 grupos). Entretanto, não houve efeito de interação (Figura 20).

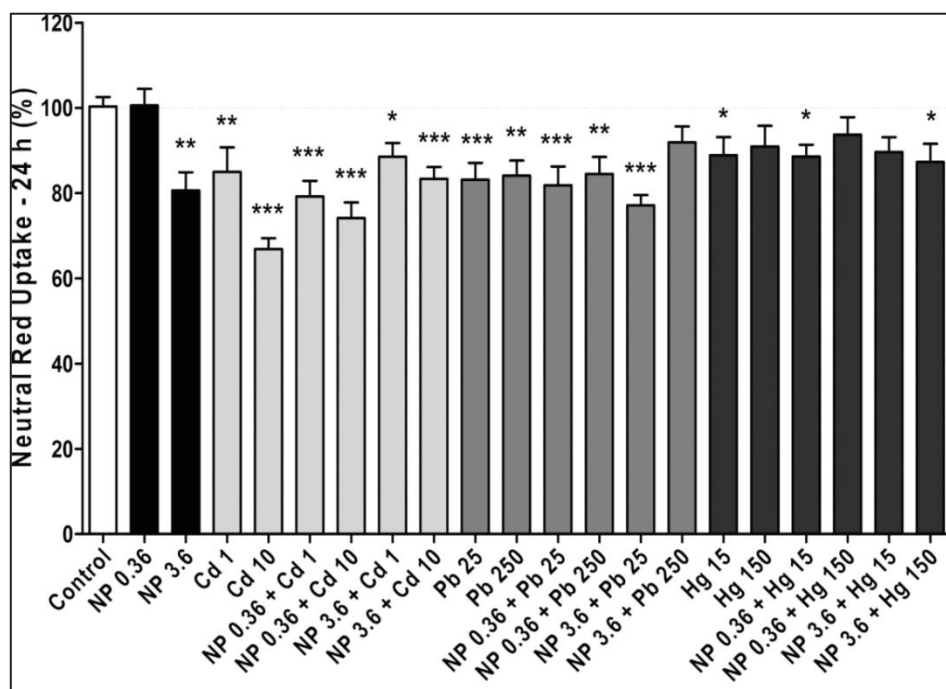


Figura 20. Citotoxicidade pelo ensaio de Retenção do Vermelho Neutro após 24 h de exposição. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativa em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). O símbolo # indica interação (diferença significativa entre a mistura e os contaminantes isolados) ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média + erro padrão de três experimentos independentes. Concentrações: AgNP em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM .

Fonte: A autora (2017)

Entretanto, a redução da retenção do vermelho neutro não foi proporcional à redução do número de células viáveis, apresentado no item 5.4.1. Sabendo que a incorporação do Vermelho Neutro por células viáveis pode ser modificada por alterações na superfície celular ou na membrana lisossomal uma proposição para esse fato é a de que o contato com os contaminantes pode ter causado a ativação das células viáveis, acarretando em maior produção de vesículas endocíticas e consequentemente uma maior retenção do corante vermelho neutro em todos os grupos, minimizando e mascarando as diferenças. Xu et al (2015) demonstrou que Nanopartículas de Prata induziram o acúmulo de autofagossomos em monócitos THP-1 pelo bloqueio do fluxo autofágico e levaram a uma deficiência lisossomal significativa incluindo alcalinização e diminuição da estabilidade da membrana lisossomal. Além disso, diferenças pouco evidentes no teste do vermelho neutro ou mascaradas por reações intracelulares da célula RAW 264.7 também foram observadas por Martins de Oliveira Junior (2015) em seu estudo.

5.4.4 Cristal violeta

O ensaio do cristal violeta (Kueng et al., 1989) avalia a proliferação celular através da coloração dos ácidos nucleicos das células aderidas na placa, as quais são consideradas viáveis. Assim, a quantidade de corante absorvido pela monocamada celular e a intensidade da cor produzida é proporcional ao número de células (Naseer, 2009).

Nesta análise o número de células aderidas diminuiu após a exposição aos 3,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NPs-Ag (10%), aos 3 metais (variando de 10 a 68%), as misturas de NP + Cd (4 / 4 grupos) e NP + Pb (4 / 4 grupos) e 1 mistura de NP + Hg, contudo não houve efeito de interação (Figura 21).

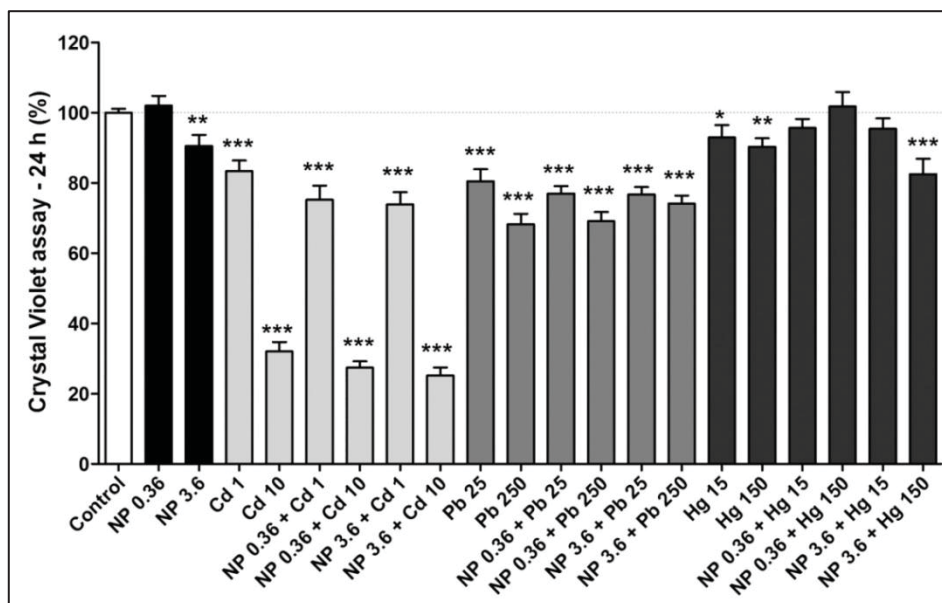


Figura 21. Citotoxicidade pelo ensaio do Cristal Violeta após 24 h de exposição. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativa em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). O símbolo # indica interação (diferença significativa entre a mistura e os contaminantes isolados) ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como média + erro padrão de três experimentos independentes. Concentrações: AgNP em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM .

Fonte: A autora (2017)

5.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os níveis de EROs apresentaram-se aumentados em relação ao controle após 4h de exposição a $3,6 \mu\text{g ml}^{-1}$ de AgNP (32%), os 3 metais (variando de 29 até 40%) e as misturas de NP + Cd (1/4 grupo), NP + Pb (3/4 grupos) e NP + Hg (1/4 grupos), (Figura 22A), sugerindo que os mecanismos pelos quais a célula responde à exposição já haviam iniciado nesse momento.

Entretanto, após 24h de exposição os níveis de EROs da maioria dos grupos permaneceu semelhante ao do grupo controle, exceto para a mistura de NP + Hg, que diminuiu. No entanto, para o grupo NP 3,6 e Cd 10, os níveis continuaram praticamente iguais quando expostos isoladamente, mas aumentaram de 135% (em 4h) para 483% (aumento de 3,5 vezes) quando expostos à associação dos dois contaminantes. Embora, menos expressivo, os níveis dos grupos NP 0.36 + Cd1 assim como NP 0.36 + Cd 10 também foram maiores que os grupos isolados. De forma contrária, o grupo NP 3.6 + Pb 25 teve uma diminuição nos níveis em relação aos contaminantes de forma isolada (Figura 22B).

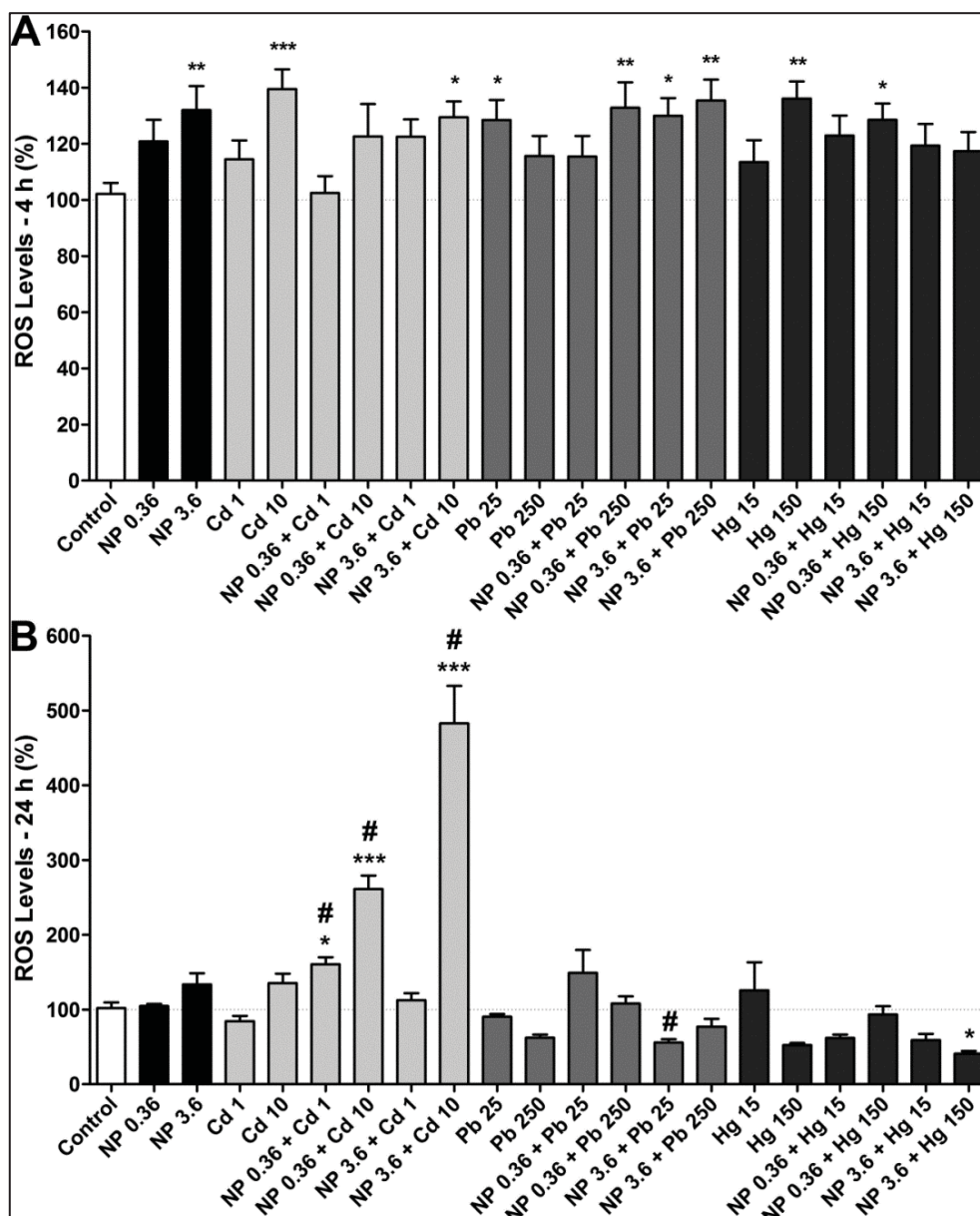


Figura 22. Níveis de espécies reativas de oxigênio após 4 e 24 horas de exposição aos contaminantes, normalizados pela viabilidade celular determinada pelo ensaio do azul de tripan. Média \pm erro padrão. Asteriscos (*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). O símbolo # indica a interação (diferença significativa entre a mistura e os contaminantes isolados) ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como a média + erro padrão de três experimentos independentes. Concentrações: AgNP em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM . A interação foi evidente nas misturas NP + Cd.

Fonte: A autora (2017)

Todos os grupos expostos por 4 h apresentaram aumento dos níveis de EROs acima dos níveis do grupo controle, e aproximadamente 50% foram considerados estatisticamente significativos. Estes resultados podem estar correlacionados com o aumento da atividade das desidrogenases, uma vez que as mitocôndrias são sítios importantes de produção de EROs, e o desacoplamento do transporte de elétrons de Cd^{2+} e Hg^{2+} (Wang et al., 2004,

Belyaeva et al., 2008). Além disso, os metais podem causar depleção de antioxidantes como a glutathiona (GSH) e inibir enzimas antioxidantes através da reação de grupos tióis críticos (Hansen et al., 2006; Nesci et al., 2016).

Após 24 h de exposição a NP + Cd, as células tiveram aumento dos níveis de EROs, o que não foi observado para as células expostas a Pb^{2+} , Hg^{2+} e misturas de NP + Pb e NP + Hg. Isso confirma os dados de alta toxicidade de NPs e Cd aos macrófagos e o potencial imunotóxico desses contaminantes. O aumento dos níveis de EROs está bem descrito para células expostas a Cd^{2+} (Murugavel et al., 2007) e NP-Ag (Piao et al., 2011; Park et al., 2011; Chairuangkitti et al., 2013) como um dos principais mecanismos de toxicidade e nesse estudo pode-se observar de forma bastante acentuada, um aumento relevante de EROs (até 3 vezes) nas células expostas à mistura de ambos os contaminantes (NP + Cd) durante 24 h. Além disso, as NPs-Ag podem induzir a um processo adicional de produção de EROs pelo aumento da atividade da NADPH oxidase (Pal et al., 2016), que é biologicamente associada à eliminação de agentes patogênicos ou partículas estranhas.

5.6 Óxido Nítrico (NO)

Houve diminuição dos níveis de óxido nítrico após 4 h de exposição a 0,36 $\mu g\ ml^{-1}$ de AgNP (22%), 25 μM de Pb (19%) e 150 μM de Hg (28%), bem como misturas de NP + Pb (1/4 grupos) e NP + Hg (3/4 grupos) (Figura 23A). Essa redução nos níveis pode estar ligada ao curto período de exposição. Segundo Laurent (1996), uma vez iniciada a produção de óxido nítrico pela iNOS (NO sintetase induzida), ela se prolonga por várias horas até atingir concentrações altas o suficiente (da ordem de mM) para serem eficientemente tóxicas ao alvo.

No entanto, após 24 h, aumentaram os níveis de NO em Cd 10 μM (102%) e nas misturas NP + Cd (2/4 grupos) e NP + Pb (1/4 grupos, figura 23B). Ocorreram interações para misturas com os três metais: aumentos para NP + Cd (1/4 grupos, >1200%) e NP + Pb (3/4 grupos) e diminuição para NP + Hg (2/4 grupos). Em particular, foi possível verificar um aumento acentuado nos níveis de NO nas células expostas à maior concentração de Cd^{2+} ou na combinação NP + Cd (de até 13 vezes). Além disso, o aumento da taxa de morte celular foi

evidente (ensaio do azul de tripan, vermelho neutro e MTT) após a exposição de 24 h, particularmente para os grupos com os maiores níveis de NO, e ocorreu através da apoptose (como pode ser visto na seção 5.11.2).

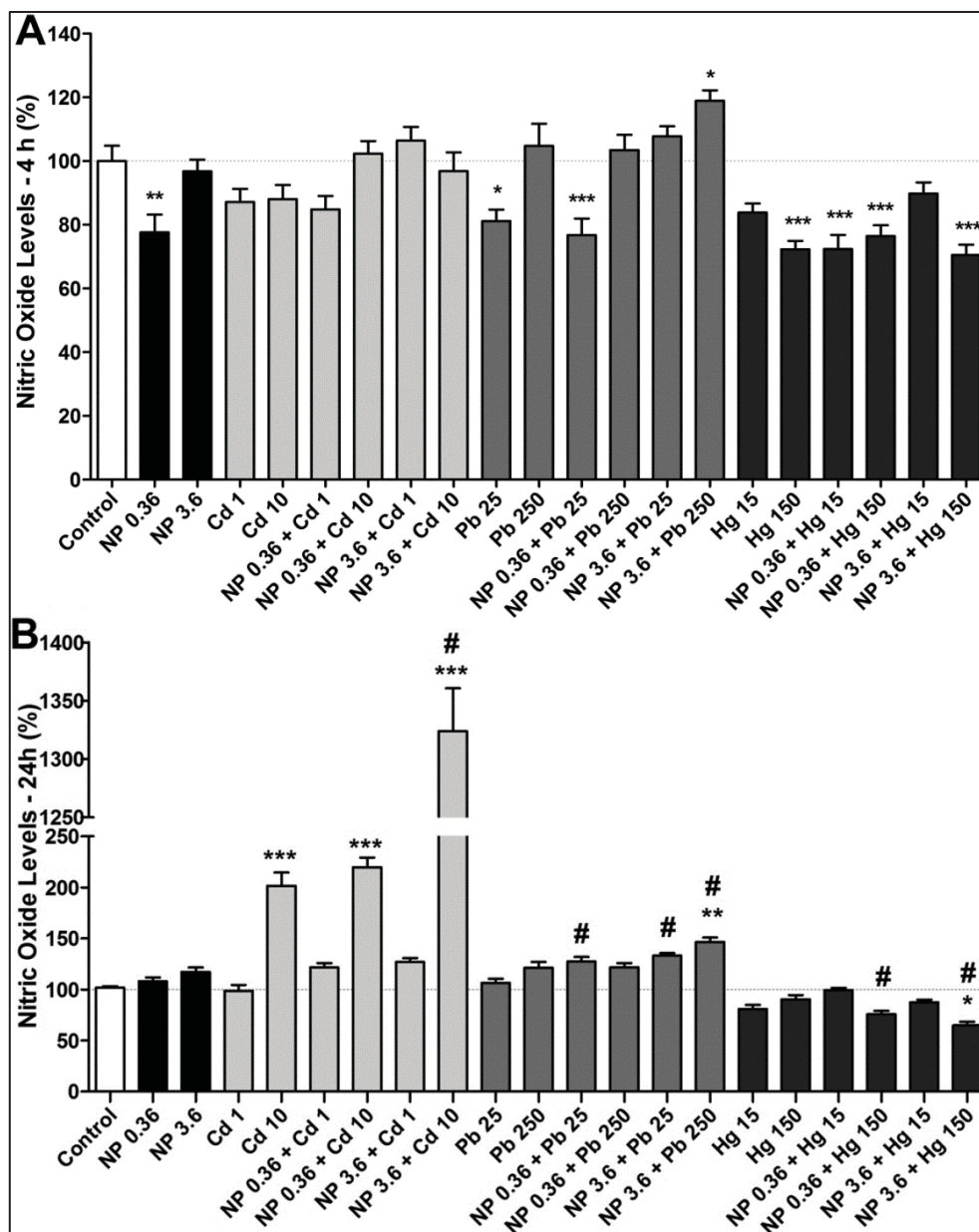


Figura 23. Níveis de Óxido Nítrico após 4 e 24 horas de exposição aos contaminantes, normalizados pela viabilidade celular determinada pelo ensaio do azul de tripan. Média \pm erro padrão. Asteriscos (*) indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). O símbolo # indica a interação (diferença significativa entre a mistura e os contaminantes isolados) ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como a média + erro padrão de três experimentos independentes. Concentrações: AgNP em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM . A interação foi evidente no experimento de 24 h.

Fonte: A autora (2017)

O papel dos níveis de NO tanto na defesa imunológica como na morte celular pode ser o motivo da falta de uma relação clara de níveis de NO e atividade fagocítica, pois houve casos em que ambos diminuíram (NP + Hg, 4 h), os níveis de NO aumentaram e a fagocitose diminuiu (NP + Pb, 4 h) e ambos aumentaram, mas com um atraso (Cd: fagocitose aos 4 h e níveis de NO às 24 h). Curiosamente, o efeito imunotóxico (diminuição dos níveis de NO e atividade fagocítica) de Hg e misturas de NP + Hg foram mais pronunciados do que os de Cd^{2+} , Pb^{2+} e misturas de NP + Cd e NP + Pb. Yanagisawa et al. (2002) também observaram em seu trabalho uma diminuição da expressão da óxido nítrico sintase cerebral após exposição ao Cloreto de Mercúrio e Santarelli et al. (2006) confirma o efeito imunotóxico do HgCl_2 observando diminuição do NO em seu estudo in vivo com camundongos. Além disso, Hg^{2+} pode ter inibido a produção de NO em macrófagos estimulados com lipopolisacarídeos através da diminuição da expressão de mRNA de iNOS e produção de proteínas (Kim et al., 2002), e foi relatado que Pb^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} podem inibir a produção de NO dependente de iNOS em resposta ao $\text{TNF}\alpha$ em macrófagos murinos (Buzard e Kasprzak, 2000).

5.7 Atividade fagocítica

A exposição a 10 μM de Cd^{2+} por 4 horas aumentou a atividade fagocítica das células. Por outro lado, a exposição a 150 μM de Hg^{2+} e as misturas de NP + Pb (2/4 grupos) e NP + Hg (4/4 grupos) diminuíram a atividade fagocítica dos macrófagos. Ocorreram interações para misturas com NP + Pb (2/4 grupos) e NP + Hg (2/4 grupos) (Figura 24).

É conhecido que a resposta do sistema imune ocorre em estágios iniciais de estresse oxidativo (Nathan, 2003; Wells et al., 2009). Por isso, a atividade fagocítica foi avaliada após 4 h de exposição e o aumento da atividade fagocítica, resposta verificada no grupo Cd 10, pode estar relacionada com o aumento da produção de EROs, verificado também em 4 h de exposição. Olabarrieta et al., (2001) também observaram o estímulo da atividade fagocítica de hemócitos de mexilhão expostos a 10 μM de Cd por 24 h mas efeitos deletérios ao citoesqueleto também foram observados. Efeitos tais como citoesqueleto

irregular e perda dos filamentos de actina foram observados em células mesangiais somente após 6 h de exposição ao Cd (Liu e Templeton, 2010).

Em contrapartida, a exposição ao Hg e suas misturas levou a uma diminuição da atividade fagocítica. Estudos já demonstraram que Hg tem ação imunossupressora (Nordlind, 1990; Voccia et al., 1994; Moszczynski, 1997; Kershaw e Hall, 2019), Ademais, metais pesados como Hg e Pb podem agir sobre a actina, proteína envolvida no mecanismo de extensão dos pseudópodos dos macrófagos, o que impediria a realização da fagocitose (Viarengo et al., 1989) além de interferir na montagem dos microtúbulos (Thier et al., 2003). Esse é um resultado que gera uma preocupação, pois esse tipo celular tem uma função importante na remoção de partículas estranhas do corpo e se um organismo apresenta tal condição, poderia estar sujeito a um quadro de imunossupressão, com maior suscetibilidade à doenças, parasitas e partículas estranhas.

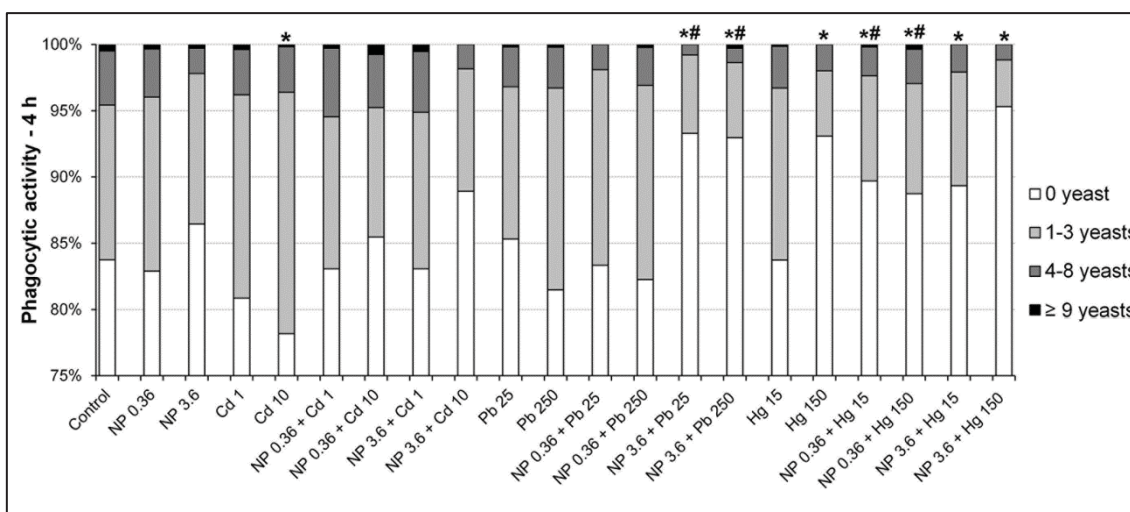


Figura 24. Atividade fagocítica após 4 h de exposição. Porcentagem de macrófagos classificados em quatro categorias, de acordo com o número de leveduras internalizadas: 0 leveduras, 1-3 leveduras, 4-8 leveduras e ≥ 9 leveduras. Os asteriscos indicam diferenças em relação ao controle (* $p < 0,05$). O símbolo '#' indica a interação (diferença significativa entre a mistura e os contaminantes isolados) ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como a média + erro padrão de pelo menos três experimentos independentes. Concentrações: AgNP em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM .

Fonte: A autora (2017)

5.8 Potencial de Membrana Mitocondrial

Não houve diferenças estatísticas entre os grupos expostos aos contaminantes durante 4 h e o controle do potencial de membrana mitocondrial (Figura 26).

A perda do potencial de membrana mitocondrial é uma característica de apoptose, sendo que este evento precede a localização da fosfatidilserina na monocamada externa da membrana plasmática e coincide com a ativação das caspases. Entretanto, ao contrário de outros tipos de células, o potencial mitocondrial da membrana interna (ψ_m) pode ser diminuído, aumentado ou mantido em células imunes, como os macrófagos, após a liberação do citocromo c das mitocôndrias (Hortelano et al., 1999, Boscá, 2005). Isso pode justificar a manutenção do potencial da membrana mitocondrial neste estudo, como pode ser observada na Figura 25.

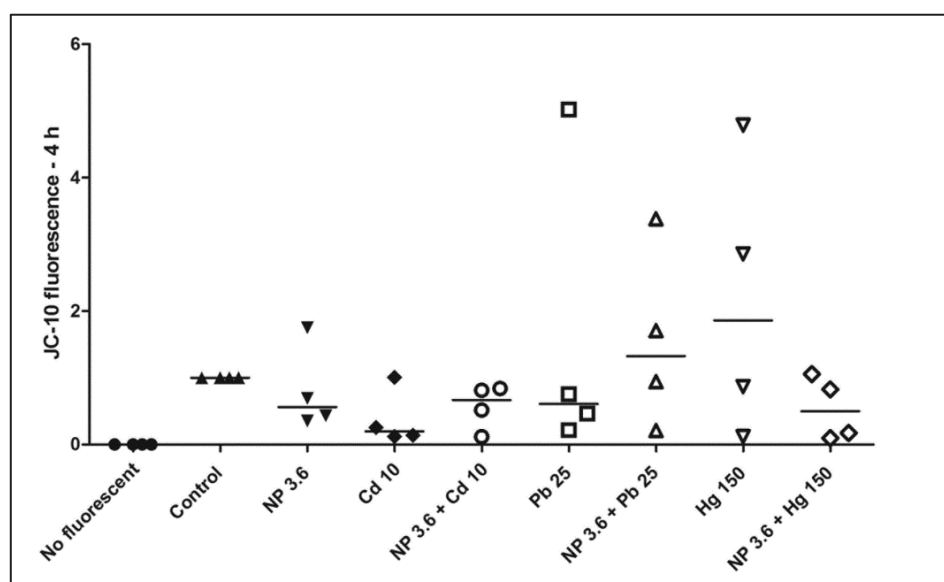


Figura 25. Potencial da membrana mitocondrial após 4 h de exposição. Potencial de membrana mitocondrial normalizado pelo grupo controle de cada experimento. Os dados são apresentados como a média + erro padrão de quatro experimentos independentes. Não houve diferença estatística. Concentrações: AgNP em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM .

Fonte: A autora (2017)

5.9 Focos de reparo de DNA

Para essa análise os núcleos de células foram agrupados em quatro classes de acordo com o número de focos de reparo de DNA, inferindo o dano causado, como mostra a Figura 26. A classe com menor número de focos (1 – 3 focos) equivale a um dano leve ao DNA. A classe seguinte (4-10 focos)

corresponde a um dano intermediário e a última classe (≥ 11 focos) representa dano grave ao DNA.

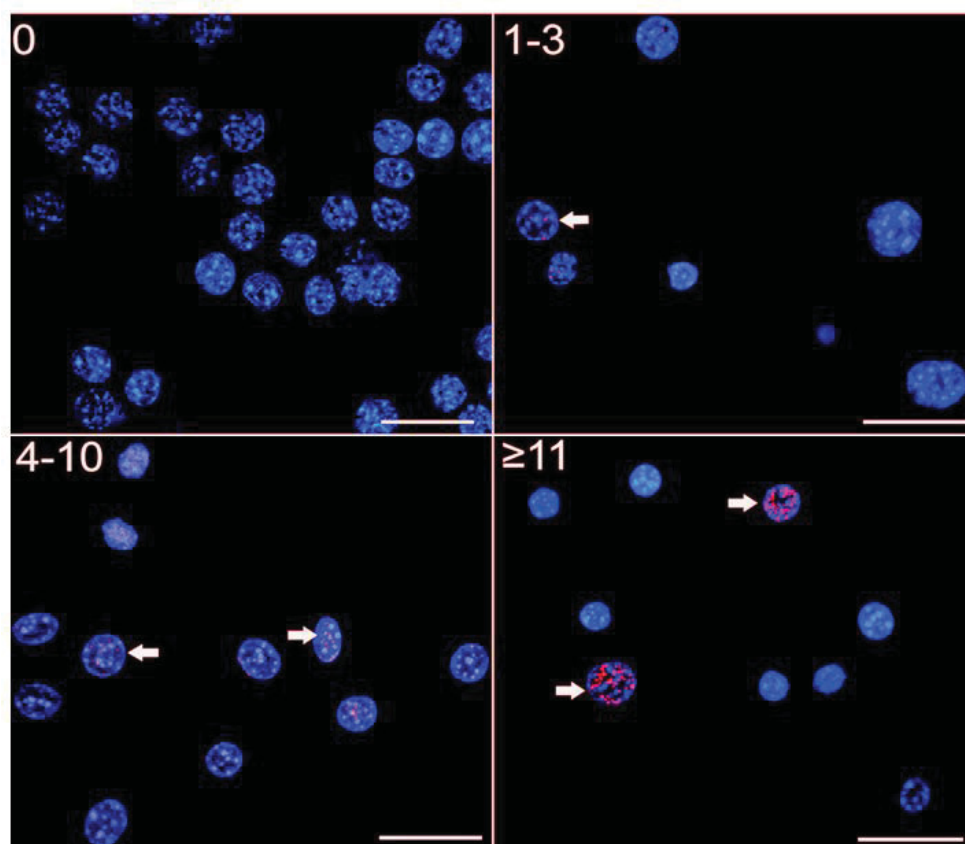


Figura 26. Focos de reparo de DNA após a exposição de 4 h sob microscópio confocal. Classes de focos de reparo do DNA quanto aos níveis de dano: 0 focos, 1 – 3 focos, 4 – 10 focos e ≥ 11 focos. Núcleos e focos de reparo de DNA (setas). Barra de escala: 50 μm . Concentrações: NP-Ag em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM .

Fonte: A autora (2017)

Essa dedução dos níveis de danos pode ser feita uma vez que cada foco representa quebra nas duas fitas do DNA em uma proporção 1:1 e o marcador $\gamma\text{-H2AX}$ é um marcador de alta sensibilidade de quebras em ambas as fitas do DNA geradas por EROs, bem como processos de replicação e reparo de DNA (Rogakou et al., 1998; Bonner et al., 2008) sendo usado como biomarcador para danos no DNA (Kuo e Yang, 2008). Por isso, o ensaio de focos de $\gamma\text{-H2AX}$ tornou-se uma ferramenta poderosa nos últimos anos devido à sua especificidade, alta reprodutibilidade, sensibilidade e rapidez (Geric et al., 2014), ganhando espaço entre os testes de genotoxicidade.

Este método é fundamentado nas quebras de dupla fita de DNA que é seguida pela fosforilação da histona H_2AX (uma histona variante da família de proteínas H_2A , e que compõe o octâmero de histonas nos nucleossomos). Logo,

a proteína fosforilada, γ -H₂AX, é o primeiro passo no recrutamento e localização das proteínas de reparo de DNA.

O aumento de focos de reparo de DNA mostrou-se dependente da concentração e foram observados para células expostas aos contaminantes isolados e também para a maioria das misturas (9/12 grupos, Figura 27). Baseado nesse resultado, observado com exposição de apenas 4 h, NPs-Ag, Cd, Pb e Hg podem ser considerados genotóxicos e são corroborados por outros relatos na literatura, para diferentes modelos biológicos (Nersesyan et al., 2016; Zhao et al., 2016).

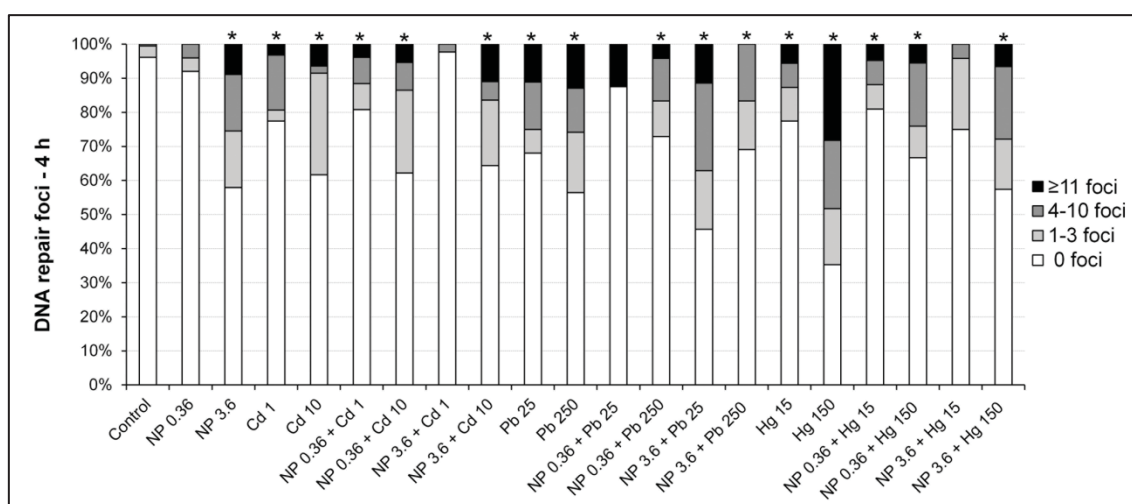


Figura 27. Porcentagem de núcleos com diferentes classes de focos de reparo de DNA após a exposição de 4 h. Concentrações: AgNP em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM . A análise estatística (Kruskal-Wallis seguida de testes de Dunns) foi realizada comparando os valores atribuídos aos núcleos de cada grupo experimental através da fórmula $\sqrt{x + 1}$, onde x é a categoria de focos de reparo do DNA para cada núcleo: 0 (nenhum foco), 1 (1-3 focos), 2 (4-10 focos) e 3 (≥ 11 focos). Asteriscos indicam diferenças em relação ao controle (* $p < 0,05$).

Fonte: A autora (2017)

De forma esperada, as células expostas aos contaminantes com níveis aumentados de ROS (exposição de 4 h) também tiveram focos de reparo de DNA aumentados, indicando que ROS pode desempenhar um papel no dano do DNA. No entanto, em alguns casos, os danos independentes de ROS podem ocorrer por vários mecanismos, incluindo a inibição das enzimas de reparo do DNA devido à reação com tióis críticos (Ag^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Hg^{2+}) (Hartwing, 1994, Cebulska -Wasilewska et al., 2005; Asharani et al., 2009b), deslocamento de zinco (Cd^{2+}) (Day et al., 1984), bem como interferência com proteínas e processos dependentes de cálcio (Cd^{2+} , Pb^{2+}) (Bressler et al., 1999; Lemarié et al., 2004). Além disso, o dano ao DNA pode induzir a apoptose através da via

dependente de p53 (Roos e Kaina, 2006), envolvendo a diminuição da viabilidade celular observada no presente estudo.

5.10 Detecção Intracelular de NPs-Ag, Cd e Pb

Houve colocalização das NPs-Ag, como agregados intracelulares, com o marcador *LysoTracker*, indicando que o destino de muitas nanopartículas foram as vesículas ácidas (Figura 28), concordando com vários trabalhos (Salvati et al., 2011; Wang et al., 2013; Guo et al., 2015;) que afirmam que essa é uma das principais localizações intracelulares das NPs-Ag.

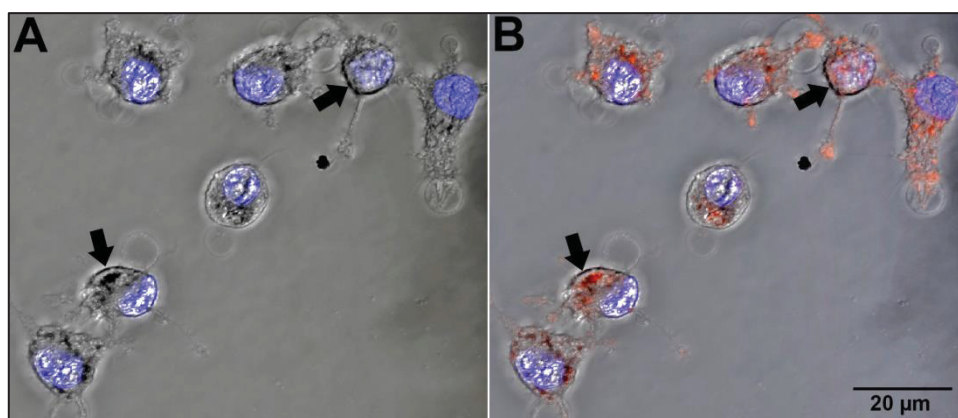


Figura 28. Co-localização das NPs-Ag e compartimentos ácidos sob microscópio confocal. Em A: Agregados intracelulares de NPs-Ag (setas); Núcleos (marcados com *Hoechst* – em azul) e em B: Os agregados intracelulares de NP-Ags se colocizam com os compartimentos ácidos (marcados com *LysoTracker* – em vermelho) .

Fonte: A autora (2017)

A marcação positiva de *Leadmium* e *LysoTracker* foi encontrada em células expostas a 25 e 250 μM de Pb. Entretanto, as células expostas a 1 e 10 μM de Cd não foram marcadas (Figura 29). Isso pode ter ocorrido devido à menor sensibilidade do marcador (sensibilidade para o Cd: na ordem de μM , e sensibilidade para o Pb: na ordem de nM) ou inibição de esterases não específicas (Hernández et al. , 2009), que clivam o grupo acetoximetilo (AM), resultando em uma forma carregada do marcador que se difunde para fora das células muito mais lentamente do que o composto original (Datasheet- Molecular Probe, 2007). Além disso, a maioria das células mortas não são marcadas e Cd^{2+} foi muito mais citotóxico do que Pb^{2+} .

Devido à marcação satisfatória de somente uma classe dos metais, a análise quantitativa e comparativa que estava prevista nesse ensaio não pôde ser realizada.

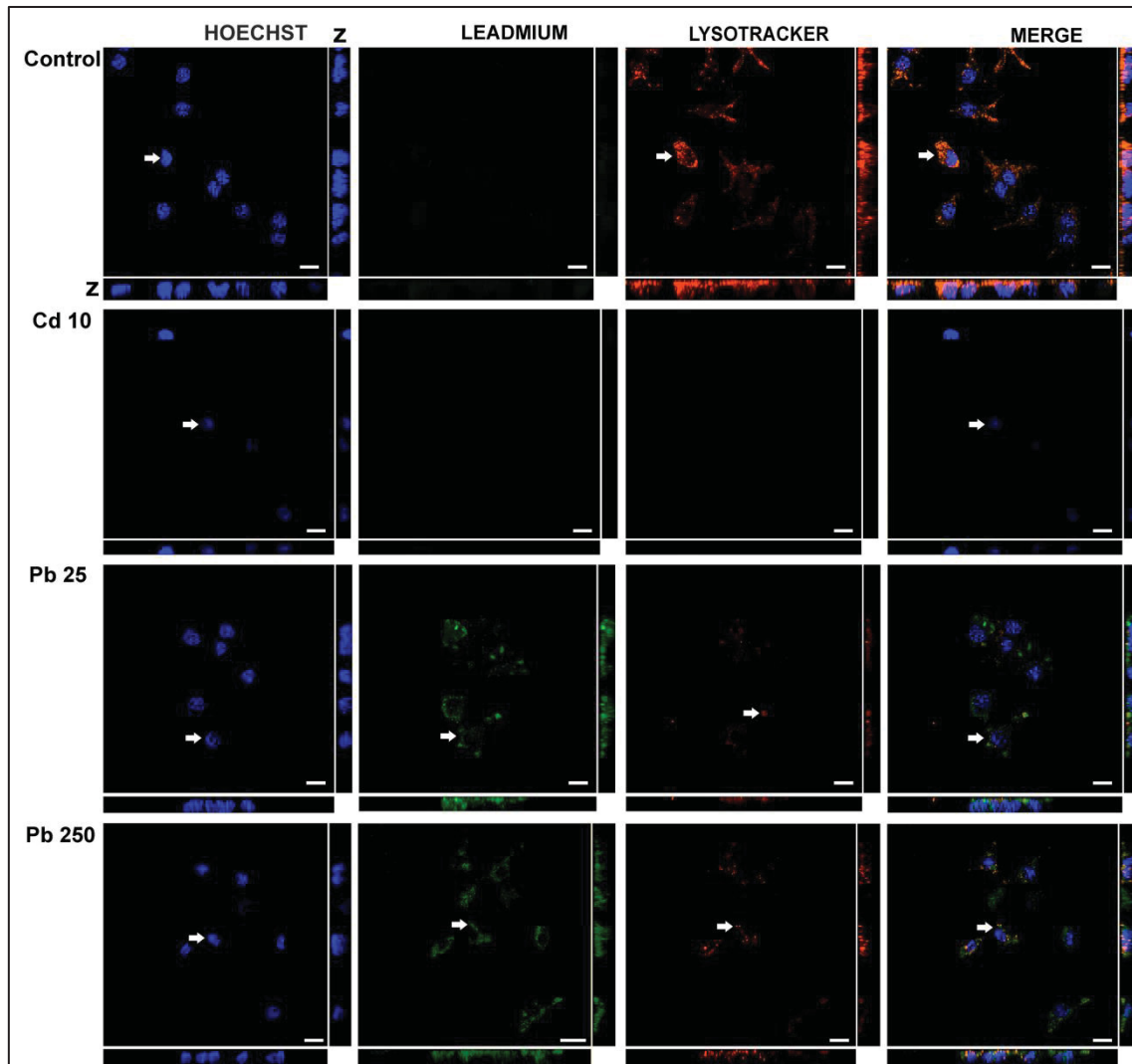


Figura 29. Detecção de fluorescência por *Hoechst* (marcador de DNA-azul), *Leadmium* (sonda específica para Cd e Pb - verde), *Lysotracker* (marcador de compartimentos ácidos-vermelho). Barra = 10 μ m

Fonte: A autora (2017)

5.11 Morte celular

A análise das taxas de morte celular foi realizada por meio do equipamento *High Content Imaging*. Além disso, uma análise sobre o tipo de morte celular e o tempo em que ocorreu se deu através de *time-lapse* em Microscópio Confocal.

5.11.1 Avaliação por *High Content Imaging*

Foram definidos, para fins estatísticos, três grupos: células viáveis, células em apoptose em estágio inicial e células que estavam em um estágio de apoptose avançado ou necrose. Considerou-se como diferença significativa uma taxa maior que 15% em relação ao grupo comparado.

Nos grupos expostos de forma isolada, houve redução de viabilidade em relação ao grupo controle e aumento da taxa de apoptose final/necrose em quase todos os grupos, exceto para o grupo Pb 25. Nas associações, houve diminuição da viabilidade nos grupos NP 3,6 + Pb 25, NP 0,36 + Hg 150 e NP 3,6 + Hg 150 em relação aos seus contaminantes isolados. Houve aumento na taxa de apoptose final/necrose na mistura NP 3,6 + Pb 250 em relação aos grupos isolados, como pode ser visualizado na Figura 30.

O resultado desse ensaio nos mostra uma grande perda de viabilidade pelos grupos, inclusive pelo grupo controle. Esse fato pode ser explicado pela utilização do Iodeto de Propídeo. Esse reagente é conhecido pela sua citotoxicidade e uma vez incorporado pelas células muda de forma significativa a fisiologia da membrana plasmática (Macklis e Madison, 1990). Dessa forma, considerando que esse reagente ficou em contato com a célula todo o tempo, pode ter levado a uma disfunção na membrana plasmática e induzido à morte celular em uma taxa maior que a observada nos ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade.

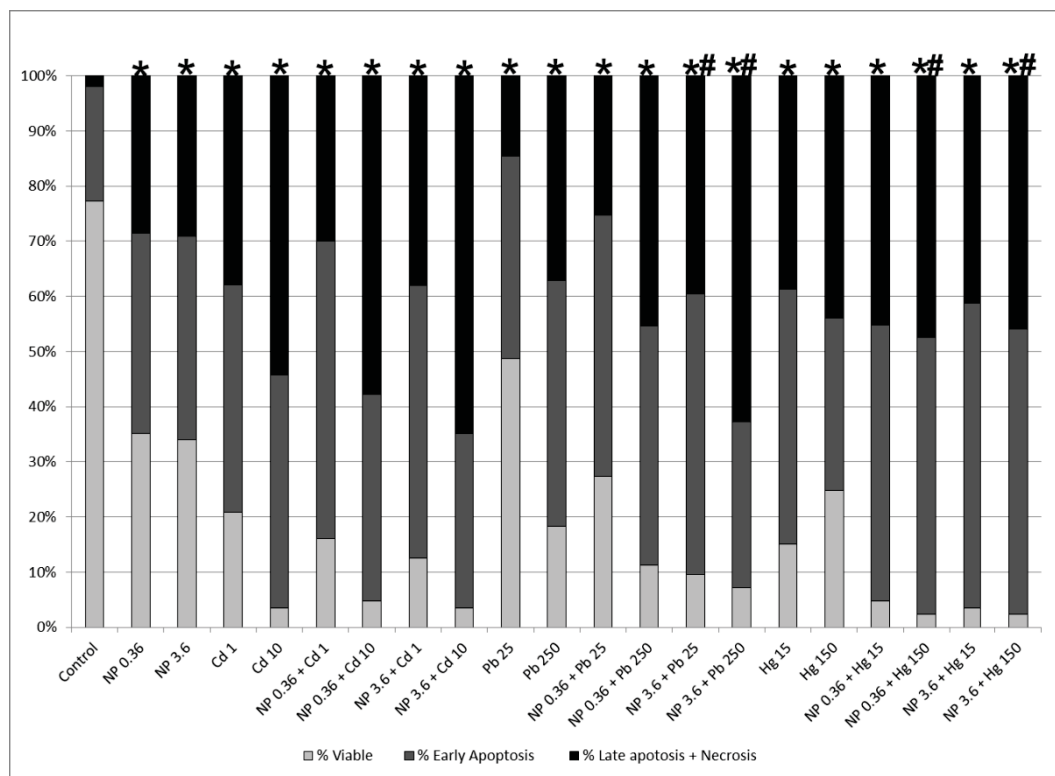


Figura 30. Taxas de viabilidade celular, apoptose inicial, e apoptose final + necrose após 24 h de exposição. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. # indica diferença significativa em relação aos mesmos contaminantes isolados. Concentrações: NPs-Ag em $\mu\text{g ml}^{-1}$ e metais em μM .

Fonte: A autora (2017)

5.11.2 Microscopia Confocal

O ensaio no Microscópio Confocal com registros ao longo das 24 h de exposição permitiu uma análise detalhada dos eventos celulares que aconteceram com as células e após quanto tempo de exposição aos contaminantes.

Analizando as imagens em time-lapse (Figura 31 / vídeo). é possível afirmar que o principal mecanismo de morte celular envolvido foi a apoptose. A marcação para apoptose (FITC - Anexina V) foi observada decorrido 6 a 8 h do início da exposição, com pouca variação entre os grupos, como apresentado na Tabela 2. Foi possível verificar efeito de interação na mistura NP 3,6 + Cd 10, cujo início da apoptose foi adiantando em 2 h em relação aos grupos dos contaminantes isolados.

Características morfológicas (retração da célula, cromatina condensada, formação de prolongamentos (*blebs*) pela membrana celular e liberação de corpos apoptóticos) associadas à marcação positiva com FITC - Anexina V e PI

marcaram o estágio final da apoptose que teve início observado entre 9 - 10 h e prosseguiu até 16 h de exposição, de acordo com o grupo experimental. Contudo, também o estágio final da apoptose iniciou mais cedo na associação entre NP 3,6 + Cd 10 (Tabela 2).

Tabela 2. Tempo que inicia os estágios de apoptose inicial e apoptose final.

Grupo Experimental	Início da Apoptose (Anexina V+ / PI -)	Final da Apoptose (Anexina V+ / PI+)
Control	10h	16 h
NP 3.6	8 h	16 h
Cd 10	8 h	14 h
NP 3.6 + Cd10	6 h	12 h
Pb 25	8h	12h
Pb 250	8h	10h
NP 3.6 + Pb 25	9h	12 h
NP 3.6 + Pb 250	7 h	11 h

A apoptose já foi relatada para outras linhagens celulares (Tsangaris e Tzortzatou-Stathopoulou, 1998, Murugavel et al., 2007, Piao et al. , 2011) mas curiosamente, as células RAW 264.7 executaram o programa de apoptose completamente (vídeo), enquanto as células do hepatoma humano (HepG2) começaram o programa de apoptose após a exposição a AgNP, Cd²⁺ e AgNP + Cd, mas aparentemente não foram capazes de completá-lo, intumescendo e rompendo por necrose (Miranda et al., 2017).

Embora a apoptose seja importante para eliminar células irreversivelmente danificadas, importantes funções imunológicas de macrófagos, como a fagocitose, requerem a preservação da integridade celular. Esta é uma situação paradoxal, porque uma certa proteção contra a apoptose é necessária para que os macrófagos desempenhem plenamente sua função, mas a morte apoptótica é essencial para evitar estratégias parasitárias por agentes patogênicos ou partículas. A aparente resistência dos macrófagos à apoptose pode ser a chave para o sucesso biológico dessas células (Boscá et al., 2005).

Além disso, acompanhando a mesma população de células ao longo do tempo de exposição, foi possível verificar que as células mortas foram rapidamente fagocitadas pelas células viáveis ao redor, deixando parte do poço sem células (Figura 18). Ademais, não foi verificado células “desaderindo” da placa.

Através desse ensaio, também foi possível verificar a absorção das NPs-Ag logo no início da exposição e a permanência delas no ambiente intracelular, dentro de vesículas, até o final do tempo de observação ou até o momento da morte celular.

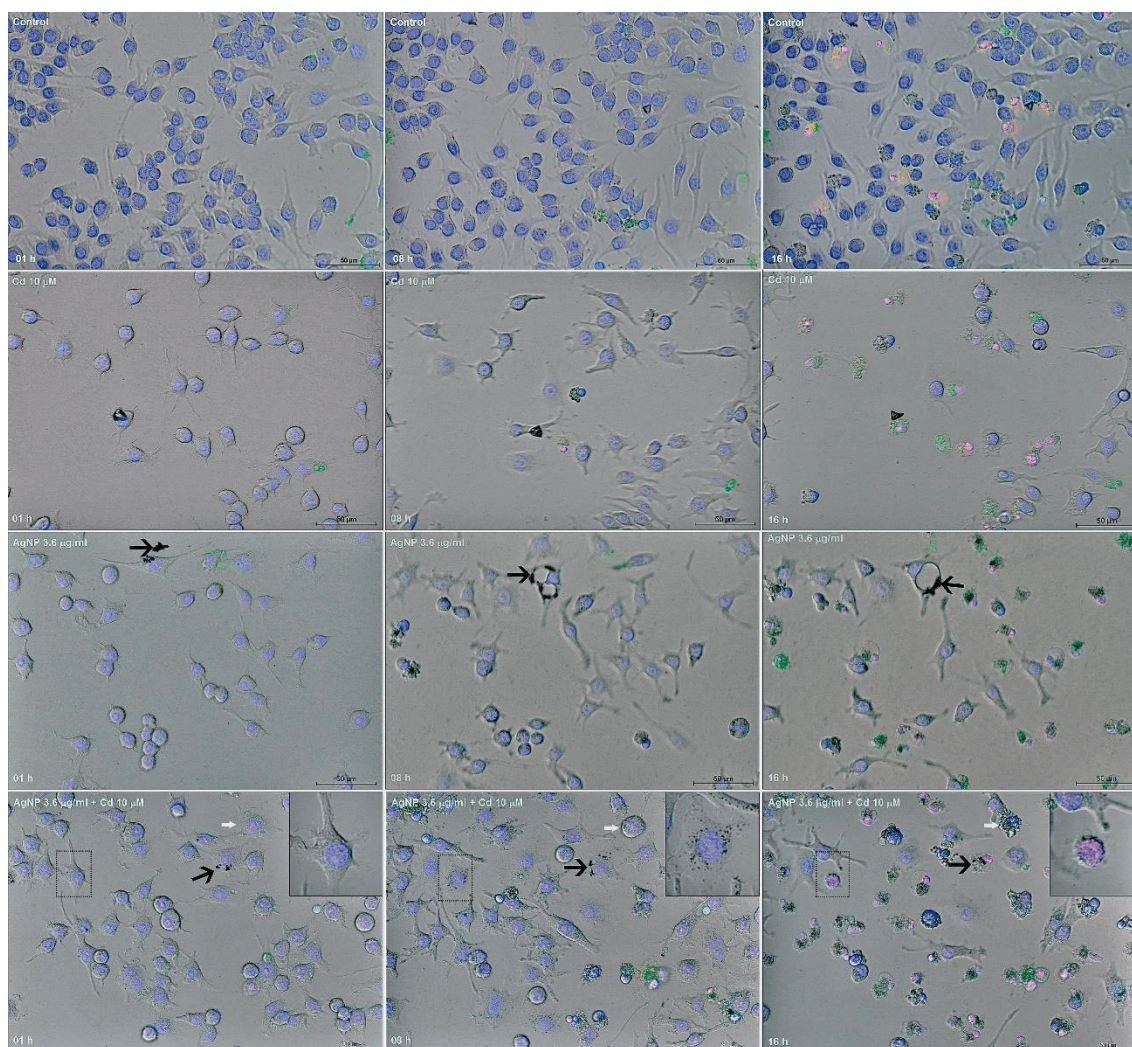


Figura 31. Imagens de *Time-lapse* das células RAW 264.7 expostas a NPs-Ag, Cd e NPs+Ag + Cd durante 24 h em meio de cultura DMEM, 5% de CO₂ e 37 °C. *Hoechst* marca o núcleo de células viáveis em azul. A anexina V-FITC liga na fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática das células apoptóticas em verde. O iodeto de propídio marca o núcleo de células não viáveis (células com membrana plasmática danificada) em laranja. A sobreposição de *Hoechst* e iodeto de propídio é rosa. Imagens de apenas três tempos (01, 08 e 16 h) são mostradas nessa figura. A internalização das NPs-Ag é apontada pelas setas pretas e a progressão da apoptose pode ser vista nas setas brancas. Células marcadas em verde – células que entraram em apoptose. Células em roxo – células que morreram por necrose.

Fonte: A autora (2017)

5.12 Western blotting

Analizamos os níveis de expressão das proteínas anti-apoptóticas XIAP e Bcl-2 após 8h de exposição aos contaminantes NPs-Ag, Cd e Pb, conforme mostra a Figura 32:

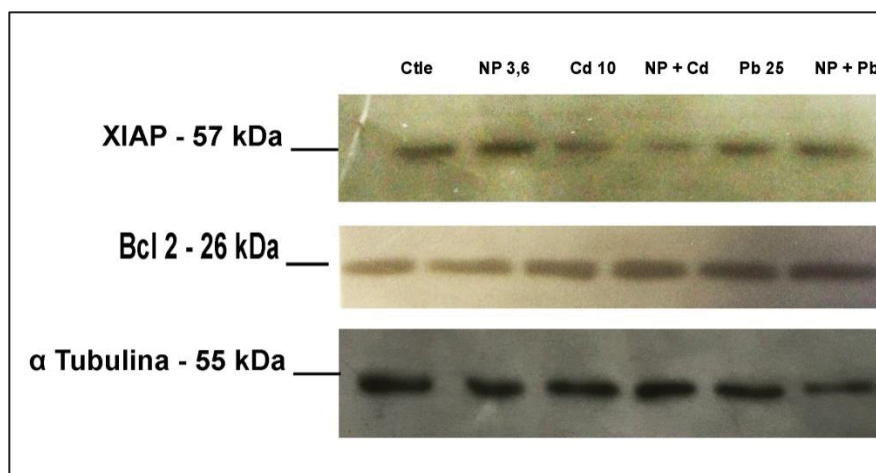


Figura 32. Expressão de proteínas XIAP e BCL-2 após 8 h de exposição a 3.6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de NPs-Ag, 10 μM de Cd, 25 μM de Pb e suas misturas. α -tubulina utilizada como controle de carregamento

Fonte: A autora (2017)

Na presença de 10 μM de Cd a proteína anti-apoptótica XIAP teve sua expressão diminuída, e na mistura NP 3.6 + Cd 10 a redução foi mais acentuada. Zhao et al. (2020) demonstraram em células neuronais que as EROs mitocondriais induzidas por Cd reduziram a expressão da XIAP, levando a apoptose das células. Watien et al. (2002) observaram a indução da apoptose por ativação de caspase 9 e embora não haja certeza que a via envolvida é a das IAPs, pode ser uma sugestão para explicar a apoptose.

XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) é uma proteína pertencente à família das IAPs (*Inhibitor of apoptosis protein*) com função de bloquear o mecanismo da apoptose por inibir diretamente e especificamente, tanto a caspase iniciadora 9, quanto as caspases efetoras 3 e 7 (como mostra a Figura 33), sendo considerada a mais potente inibidora da apoptose dessa família (Deveraux et al., 1997, Fulda e Vucic, 2012).

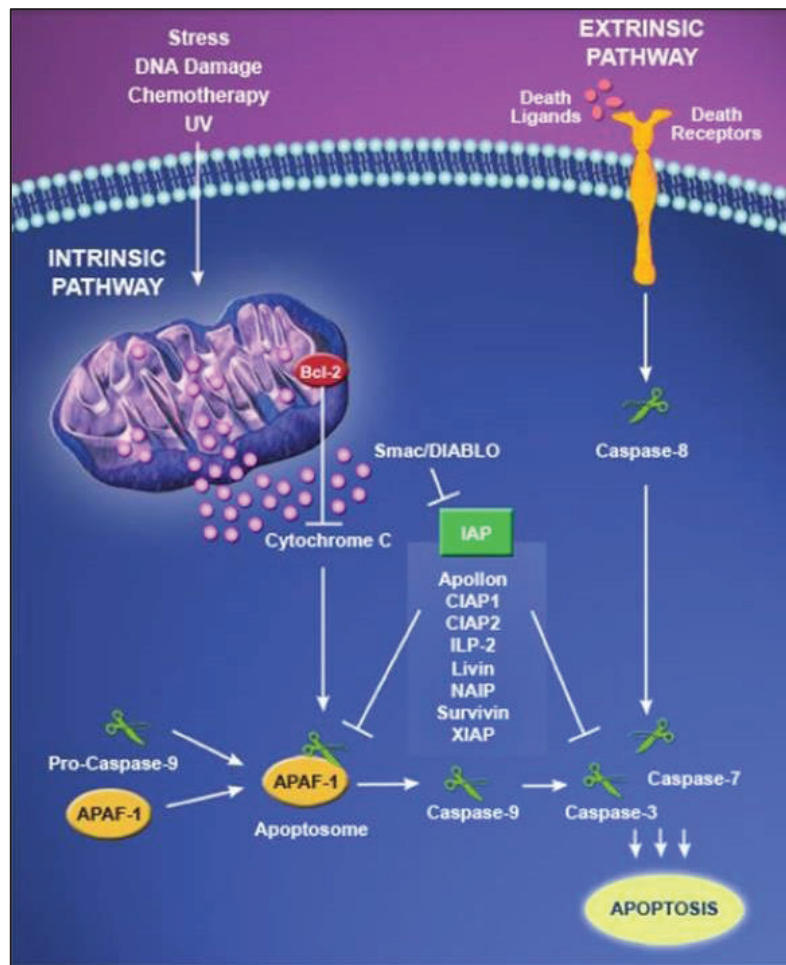


Figura 33. Via simplificada da apoptose. Ativação da apoptose por ligação ao receptor de morte celular ou por estresse intracelular resulta na ativação das caspases efetoras 3 e 7 que podem ser inibidas pela XIAP.

Fonte: Hütten (2013)

Em relação à expressão da proteína Bcl-2 não foram observadas alterações significativas nos níveis em relação ao controle do experimento (Figura 32).

A proteína Bcl-2 inibe a morte por apoptose, sendo considerada reguladora anti-apoptótica pois previne a liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol. Ademais, a expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (Heiden e Thomson, 1999). Estudos demonstraram que as células expostas ao Cd, que sofreram apoptose tiveram uma diminuição na expressão da Bcl-2 (Kim et al., 2000, Cai et al., 2004).

Entretanto, é conhecido que a superexpressão da Bcl-2 está relacionada com o desenvolvimento de malignidades (Cotter, 2009), sendo superexpressa

em células cancerígenas como adenomas, carcinomas colorretais etc (Bronner et al., 1995) e esse pode ser um fator pelo qual não visualizamos a diminuição da expressão dessa proteína

5.13 Considerações Finais

Analisando os efeitos em conjunto pode-se observar que os resultados foram mais evidente em NP-Ag + Cd seguido pelos grupos expostos à NP-Ag + Pb e com efeitos mais discretos em NP-Ag + Hg.

Para melhorar a compreensão, 1 grupo de cada contaminante, cujos efeitos foram os mais pronunciados (NP 3,6 + Cd 10, NP 3,6 + Pb 25 e NP 3,6 + Hg 150), foram escolhidos para a organização de esquemas (Figuras 34, 35 e 36). Nestes, os efeitos são correlacionados.

No grupo NP 3,6 + Cd 10 se observa que em apenas 4 h após o início da exposição houve efeitos (EROs e Dano ao DNA) que levaram ao aumento da expressão da proteína XIAP, detectada após 8 h de exposição. Esta, por sua vez, pode ser a via que levou à morte celular, observada em 24 h (Figura 34).

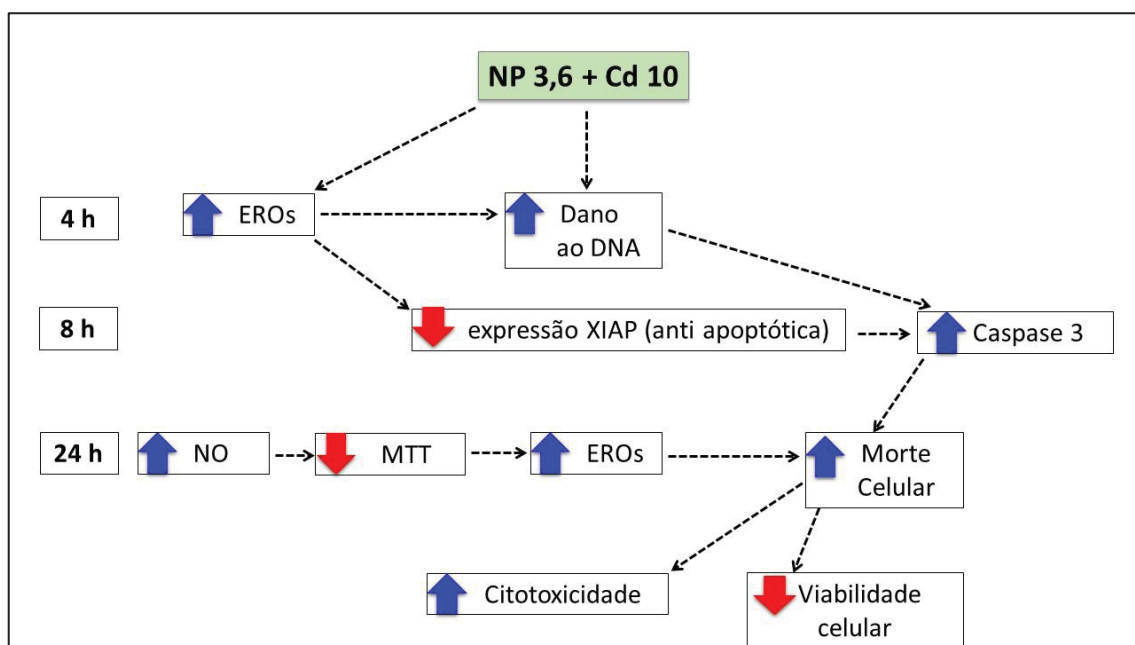


Figura 34. Principais efeitos em células RAW 264.7 após 4, 8 e 24 h de co-exposição à 3.6 µg.ml⁻¹ de nanopartículas de prata e 10 µM de Cloreto de Cádmio (NP 3,6 + Cd 10).

Fonte: A autora (2017)

No grupo NP 3,6 + Pb 25 também são observados efeitos em 4 h de exposição (aumento do MTT, EROs e Dano ao DNA) que sugere-se estar relacionados com o aumento da citotoxicidade e morte celular em 24 h e consequentemente, diminuição do MTT (Figura 35).

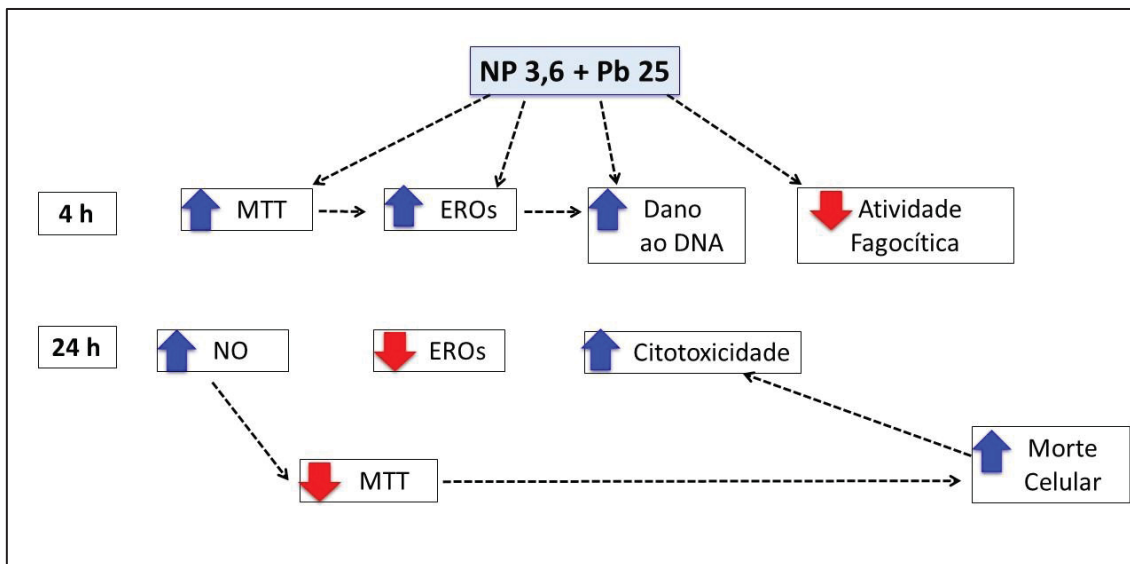


Figura 35. Principais efeitos em células RAW 264.7 após 4 e 24 h de co-exposição à 3.6 µg.ml⁻¹ de nanopartículas de prata e 25 µM de Nitrato de Chumbo (NP 3,6 + Pb 25).

Fonte: A autora (2017)

O grupo NP 3,6 + Hg 150 também demonstrou efeitos em 4 h de exposição (aumento do MTT e Dano ao DNA) que podem estar relacionados com o aumento da citotoxicidade e morte celular em 24 h (Figura 35).

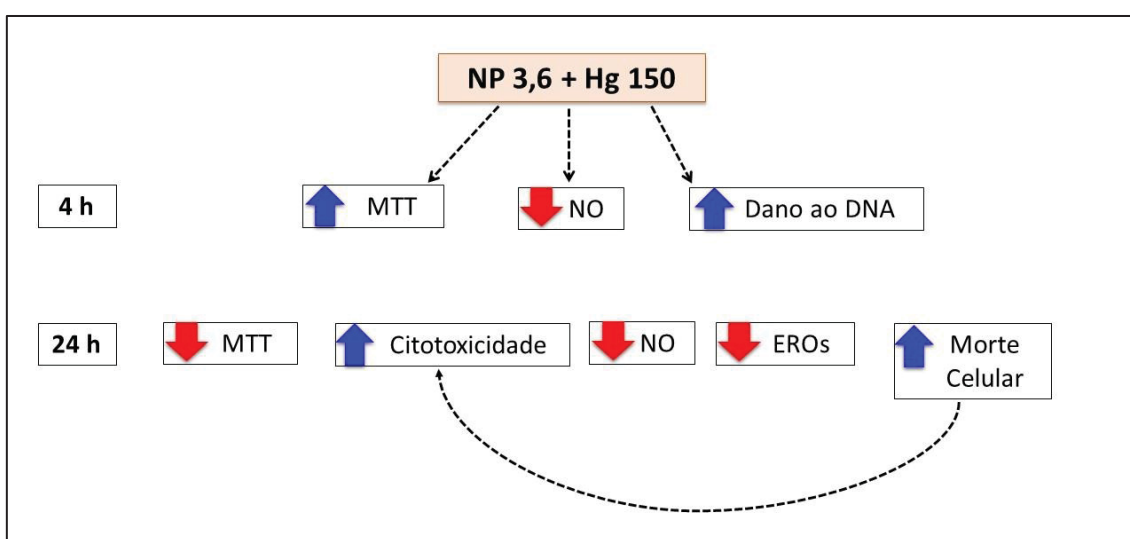


Figura 36. Principais efeitos em células RAW 264.7 após 4 e 24 h de co-exposição à 3.6 µg.ml⁻¹ de nanopartículas de prata e 150 µM de Cloreto de Mercúrio (NP 3,6 + Hg 150).

Fonte: A autora (2017).

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo fornecem informações importantes sobre a interação das NPs-Ag com cádmio, chumbo e mercúrio em células RAW 264.7:

As nanopartículas de prata localizaram-se principalmente em compartimentos ácidos.

A exposição à mistura de NPs-Ag e metais leva a efeitos não observados quando testados sozinhos, bem como diminuição da viabilidade celular, aumento da citotoxicidade, elevação dos níveis de ROS e dos focos de reparo do DNA

Grupos expostos à mistura de NP-Ag + Pb assim como NP-Ag + Hg apresentaram uma diminuição da atividade fagocítica.

A morte celular ocorreu principalmente por apoptose, até mesmo nas maiores concentrações dos contaminantes.

A redução da expressão da XIAP, o aumento de EROs e danos do DNA são eventos que podem estar relacionados com o recrutamento da via intrínseca da apoptose.

O efeito de interação foi mais evidente em NP-Ag + Cd seguido por NP-Ag + Pb e sem efeito em NP-Ag+Hg

Alguns efeitos (citotoxicidade – MTT, níveis de EROs e NO) foram observados após 4 h e tornaram-se mais pronunciados em 24 h após a exposição

Os efeitos das misturas reforçam a necessidade de estabelecer melhor o risco de exposição às misturas de contaminantes ambientais, tais como nanopartículas e metais não essenciais, já que não podemos prever o efeito final baseado apenas nos dados das exposições de contaminantes isolados.

REFERÊNCIAS

- ADEREM, A., UNDERHILLI, D.M.; Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu.Rev. Immunol**, v. 17, p. 593-623, 1999.
- AHMED, K.B.R., NAGY, A.M., BROWN, R.P., ZHANG, Q., MALGHAN, S.G., GOERING, P.L., Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. **Toxicology in Vitro** 38,179–192, 2017.
- ALMEIDA, F.V., CENTENO, A.J., BISINOTI, M.C., JARDIM, W.F., Persistent toxic substance (PTS) in Brazil. **Quím. Nova**, 30, 8, 2007.
- ASHARANI, P.V., HANDE, M.P., VALIYAVEETIL, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. **BMC Cell Biol.** 10, 65, 2009.
- ASHARANI, P.V., LOW KAH MUN, G., HANDE, M.P., VALIYAVEETIL, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS nano** 3 (2), 279-290, 2009b.
- AUGER, M.J., ROSS, J.A. **The biology of the macrophages. In: The natural immune system: the macrophage.** Eds. C.E. Lewis & J.O.D. McGee, IRL Press, Oxford, New York, Tokio, p.1-57, 1992.
- BAUERLE, P.A.; RUPEC, R.A.; PAHL, H.L. Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. **Pathol Biol.**, v. 44, n. 1, p. 29-35, 1996.
- BAUN, A.; SORENSEN, S. N.; RASMUSSEN, R. F.; HARTMANN, N. B.; KOCH, C.B. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. **Aquatic Toxicology**, v. 86, p.379- 387, 2008.
- BELYAEVA, E.A., DYMKOWSKA, D., WIECKOWSKI, M.R., WOJTCZAK, L., Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. **Toxicology and Applied Pharmacology** 231, 34–42, 2008.
- BENOV, L.; SZTEINBERG, L.; FRIDOVICH, I.; Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. **Free Radic.Biol. Med.**, v.25, p.826-831, 1998.
- BERNE, B. J.; PECORA, R. Dynamic Light Scattering: With applications to Chemistry, **Biology and Physics.** Dover, 2000.
- BOLS, N. C., V. R. DAYEH, L. E. J. LEE & K. SCHIRMER. Chapter 2 **Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish.** Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochem. Mol. Biol. Fishes. T. P. Mommsen and T. W. Moon, Elsevier. Volume 6: 43-84, 2005.

BONNER, W.M., REDON, C.E., DICKEY, J.S., NAKAMURA, A.J., SEDELNIKOVA, O.A., SOLIER, S., POMMIER, Y., Gamma H2AX and cancer, **Nat. Rev. Cancer** 8, 957–967, 2008.

BOSCÁ, L., ZEINI, M., TRAVÉS, P.G., HORTELANO, S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. **Toxicology** 208, 249–58, 2005.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochem.** v.72, p.248-254, 1976.

BRONNER M.O., CULIN C., REED J.C., FURTH E.E. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal tumor progression model. **Am J Pathol.** 146:20-26, 1995.

BUCIO, L.; SOUZA V.; ALBORES A.; SIERRA, A.; CHÁVEZ, E.; CÁRABEZ, A. ; GUTIÉRREZ-RUIZ, M.C.; Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). **Toxicology** 102, 285-299, 1995.

BUNDSCHUH M., FILSER, J., LUDERWALD, S., MCKEE M.S., METREVELI, G., SCHAUMANN, G.E., SCHULZ, R., WAGNER, S., Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? **Environ Sci Eur** 30:6, 2018.

BUZARD, G.S., KASPRZAK, K.S., Possible roles of nitric oxide and redox cell signaling in metal-induced toxicity and carcinogenesis: a review. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.** 19, 179-99, 2000.

CAI Y., REN X., XU D., WANG M., WU X. Apoptosis induced by cadmium and the expression of Bcl-2 and p53 genes in LLC-P1 cells. **Wai Sheng Yan Jiu** 33:663–5, 2004.

CARLSON, C., HUSSAIN, S.M., SCHRAND, A.M., BRAYDICH-STOLLE, L.K., HESS, K.L., JONES, R.L., SCHLAGER, J.J., Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **J Phys Chem B**, 112,13608–19, 2008.

CASTRO, E.G. **Nanopartículas de Platina e seus Nanocompósitos com Nanotubos e Outras Formas de Carbono: Preparação, Caracterização e Propriedades.**- Tese de Doutorado, UFPR, 2009.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A., PANEK, A., ZABÍNSKI, Z., MOSZCZYNSKI, P., AU. W.W., Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. **Mutation Research** 586, 102–114, 2005.

CHEN, L., BAI, L.Q., ZHU, X., ZHANG, J., WEI, Q., LI, D., GAO, C., LI, J., ZHANG, Z., LIU, C., HE, Z., ZENG, X., ZHANG, A., QU, W., ZHUANG, Z., CHEN, W., XIAO, Y., Heavy Metal-induced Metallothionein Expression Is Regulated by

Specific Protein Phosphatase 2A Complexes . **J. Biol. Chem.** 289:22413-22426, 2014.

CHEN, S.F., ZHANG H. Aggregation kinetics of nanosilver in different water conditions. **Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol** 3. 035006, 2012.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H.J.; Nanosilver: a nanoproduct in medical application. **Toxicol.Lett.**176 (1), 1-12, 2008.

COTTER T.G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nat Rev Cancer** 9(7):501-7, 2009.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. **DDT (dicloro difenil tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão**. Quim. Nova, 25, 995-1002, 2002.

DAY, F.A., FUNK, A.E., BRADY, F.O., In vivo and ex vivo displacement of zinc from metallothionein by cadmium and by mercury. **Chemico-Biological Interactions** 50, 159-174, 1984.

DE LA FUENTE M., DEL RIO M., FERRANDEZ M.D., HERNANZ A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrinreleasing peptide and neuromedin. **C. Immunol**; 73:205-211, 1991.

DEVERAUX, Q.L., TAKAHASHI, R., SALVESEN, G.S., REED, J.C., X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. **Letters to Nature**, 388, 300-304, 1997.

DONG, C., YAN, Z., KOKX, J., CHRISEY, D.B., DINU, C.Z. Antibacterial and surface enhanced Raman scattering (SERS) activities of AgCl cubes synthesized by pulsed laser ablation in liquid. **Appl. Surf.Sci.** 258, 9218–9222, 2012.

EPA, 2007.Nanotechnology White Paper. US Environmental Protection Agency Report EPA 100/B-07/001, Washington. Disponível em: <http://www.epa.gov/>.

FABBRI, M., URANI, C., SACCO, M.G., PROCACCIANTI, C., GRIBALDO, L. Whole genome analysis and microRNAs regulation in HepG2 cells exposed to cadmium.**ALTEX** 29, 173–182, 2012.

FILHO, J. C. S. **Uma geometria alternativa para detecção do espalhamento de luz laser por partículas e microrugosidades em superfície de silício**. Tese (Doutorado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 2008.

FULDA, S., VUCIC, D., Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. **Nature reviews**, 11: 109-123, 2012.

GERIC, M.; GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V.; γ -H2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety** Volume 105, Pages 13–21, 2014.

GERSON R.J., SHAIKH, Z.A., Uptake and binding of cadmium and mercury to metallothionein in rat hepatocyte primary cultures. **Biochem J.** 15;208(2):465-72, 1982.

GLIGA, A.R., SKOGLUNG, S., WALLINDER, I.O., FADEEL, B., KARLSSON, H.L., Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. **Part Fibre Toxicol**, 11, 11, 2014.

GLINSKI, A.; LIEBEL, S.; PELLETIER, È.; VOIGT, C.L.; RANDI, M.A.F.; CAMPOS, S.X.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FILIPAK NETO, F; Toxicological interactions of silver nanoparticles and organochlorine pesticides in mouse peritoneal macrophages, **Toxicology Mechanisms and Methods**, 26(4):251-9, 2016.

GOTTSCHALK, F., SONDERE, T., SCHOLS, R., NOWACK, B., Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials for different regions. **Environ. Sci. Technol.** 43, 9216–9222, 2009.

GOYER, R.A. Lead toxicity: current concerns. **Environ. Health Perspect.** v.100, p.177–187, 1993.

GUO D., ZHANG J., HUANG Z., JIANG S., GU N. Colloidal silver nanoparticles improve anti-leukemic drug efficacy via amplification of oxidative stress *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 126, 198–203, 2015.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals reactive species and toxicology. Free radicals in biology and medicine, **New York: Oxford University Press**, p.544-616, 1999.

HANSEN, J.M., ZHANG, H., JONES, D.P., Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. **Free Radical Biology & Medicine** 40, 138– 145, 2006.

HORTELANO S., ALVAREZ A.M., BOSCA L., Nitric oxide induces tyrosine nitration release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. **FASEB. J.** 13, 2311–2317, 1999.

HURT, R.H.; MONTHIOUX, M.; KANE, A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. **Carbon**, v.44, p.1028–1033, 2006.

HÜTTEN, M.O. **Avaliação dos efeitos do silenciamento de XIAP no mecanismo da autofagia em gliomas.** Trabalho de conclusão de curso, Porto Alegre, 2013.

IARC, Summaries & evaluations: Cadmium and cadmium compounds (Group1). Lyon, International Agency for Research on Cancer, p. 119 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 58; <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol58/mono58-2.html>), 1993.

JAIN, P.K., HUANG, X., EL-SAYED, I.H. e EL-SAYED, M.A. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and the Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology and Medicine. **Accounts of Chemical Research**, p. 2008.

JIRAVOVA, J.; TOMANKOVA, K.B.; HARVANOVA, M.; MALINA, L.; MALOHLAVA, J.; LUHOVA, L.; PANACEK, A.; MANISOVA, B.; KOLAROVA, H.; The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology** 96, 50-61, 2016.

KERSHAW, J.L., HALL, A.J. Mercury in cetaceans: Exposure, bioaccumulation and toxicity. **Science of The Total Environment**, 694, 133683, 2019.

KIM, M.S., KIM, B.J., WOO, H.N., KIM, K.W., KIM, K.B., KIM, I.K., JUNG, Y.K. Cadmium induces caspase-mediated cell death: suppression by Bcl-2. **Toxicology**, 145(1), 27–37, 2000.

KIM, S.H., JOHNSON, V.J., SHARMA, R.P., Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways. **Nitric Oxide** 7, 67-74, 2002.

KLAINE, S. J., ALVAREZ, P. J. J., BATLEY, G. E., FERNANDES, T. F., HANDY, R. D., LYON, D. Y., MAHENDRA, S., MCLAUGHLIN, M. J., LEAD, J. R. Nanomaterials in the Environment: Behavior, Fate, Bioavailability and Effects. **Environ Toxicol Chem.** p.1825-1851, v. 27, 2008.

KLIMP, A.H.; VRIES,E.G.E.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T.; A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, 44, 2, 143-161, 2002.

KORASHY, H.M., EL-KADI, A.O.S., Differential effects of mercury, lead and copper on the constitutive and inducible expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR)-regulated genes in cultured hepatoma Hepa 1c1c7 cells. **Toxicology** 201, 153–172, 2004.

KRYSTEK, P.; KETTLER, K.; VAN DERWAGT B.; JONG, W.H. Exploring influences on the cellular uptake of medium-sized silver nanoparticles into THP-1 cells. **Microchemical Journal** 120 , 45–50, 2015.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of Cells Cultured on 96-Well Plates. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n. 1, p. 16-19, 1989.

KUMAR, G., DEGHEIDY, H., CASEY, B.J., GOERING, P.L., Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. **Food Chem. Toxicol.**, 2015.

KUO, L.J. and YANG, L.X. Review: γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. **In vivo** 22: 305-310, 2008.

LAURENT, M.; LEPOIVRE, M.; TENU, J. P.; **Biochem. J.** 314, 109, 1996.

LEBLANC, G. A. Trophic-level differences in the bioconcentration of chemicals: implications in assessing environmental biomagnification. **Environ Sci Technol.** 1;29(1):154-60, 1995.

LEMARIÉ, A., LAGADIC-GOSSMANN, D., MORZADEC, C., ALLAIN, N., FARDEL, O., VERNHET, L., Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. **Free Radical Biology and Medicine** 36, 1517–1531, 2004.

LEVARD, C., MITRA, S., YANG, T., JEW, A.D., BADIREDDY, A.R., LOWRY, G.V., BROWN, G.E. Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli*. **Environ.Sci. Technol.** 47, 5738–5745, 2013.

LIEBEL, S; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; DE MAGALHÃES, V. F.; DA SILVA, R. C.; ROSSI, S. C.; RANDI, M.A.F.;FILIPAK NETO, F.Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 479-488, 2015.

LIM, DH; JANG, J.; KIM, S.; KANG, T.; LEE, K.; CHOI, IH; The effects of sub-lethal concentrations of silver nanoparticles on inflammatory and stress genes in human macrophages using cDNA microarray analysis. **Biomaterials** 33:4690-4699; 2012.

LIMBACH L.K., WICK P., MANSER P., GRASS R.N., BRUININK A., STARK W.J. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. **Environ. Sci. Technol.**, 41: 4158–4163; 2007.

LINK, S. e EL-SAYED, M.A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.103, n.21, p. 4212. 1999.

LIU W.,WU Y.,WANG C., LI H.C.,WANG T.,LIAO C.Y.,CUI L.,ZHOU Q.F.,YAN B., JIANG G.B. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology** 4, 319–30, 2010.

LIU, Y., TEMPLETON, D.M., Role of the cytoskeleton in Cd²⁺-induced death of mouse mesangial cells. **Can J Physiol Pharmacol**, 88, 341-52, 2010.

LIU, Y.; LIU, J.; ISZARD, M.B.; ANDREWS, G.K.; PALMITER, R.D.; KLAASSEN C.D.; Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protect from cadmium lethality and hepatotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 135: 222-228, 1995.

LUBICK, Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles—or both? **Environ. Sci. Technol.**, 42 (23).8617; 2008.

LUOMA, S. N. **Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges?**. Woodrow Wilson International Centre for Scholars: Project on Emerging Nanotechnologies, Washington, DC, 2008.

MACHADO, F.M. AVALIAÇÃO DO USO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS, Dissertação – Florianópolis, 2012

MACKLIS, J.D. e MADISON, R.D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **Journal of Neuroscience Methods**, 31(1), 43–46, 1990.

MALVERN - Dynamic Light Scattering (DLS). Disponível em: <https://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/>
Acesso em: 08/06/2017

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E.M.; A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **J. Nanoparticle Res.** 12 (5), 1531e1551, 2010.

MARTINS DE OLIVEIRA JUNIOR, DIVINO. **Respostas celulares à corantes reativos por métodos in vitro**. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015

MASON, C. F. **Biology of freshwater pollution**. 2 nd Edition. John Willey and Sons, 351 p. 1991.

MCGILLICUDDY E.,MURRAY I.,KAVANAGH S.,MORRISON L.,FOGARTY A.,CORMICAN M.,DOCKERY P.,PRENDERGAST M.,ROWAN N.,MORRIS D. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. **Sci Total Environ.**;575:231-246, 2017.

McMURRAY, C., TAINER, J.A. Cancer, cadmium and genome integrity. **Nat. Genet.**, v.34, n.3, p.239, 2003.

MIRANDA, R.R., BEZERRA,A.G., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., RANDI, M.A.F., VOIGT, C.L., SKYTTE, L., RASMUSSEN, K.L., KJELDSEN, F., FILIPAK NETO, F., Toxicological interactions of silver nanoparticles and non-essential metals in human hepatocarcinoma cell line; **Toxicology in vitro** 40, 134–143, 2017.

MISKO, T.; SCHILLING, R.J.; SALVEMINI, D.; MOORE, W.M.; CURRIE, M.G.; A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples, **Anal. Biochem**; 214, 6–11, 1993.

MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65, 55–63, 1983.

MOSZCZYNSKI, P., Mercury compounds and the immune system: a review. **Int. J. Occup. Med. Environ. Health** 10, 247–258, 1997.

MURUGAVEL, P., PARI L., SITASAWAD, S.L., KUMAR, S., KUMAR S., Cadmium induced mitochondrial injury and apoptosis in vero cells: protective effect of diallyl tetrasulfide from garlic. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 39, 161-170, 2007.

NASEER, M.I, ZUBAIR, H., IKRAMULLAH, KIM, M.O.; **Pak. J. Med. Sci.** 25, 500-504, 2009.

NATHAN, C.; Immunology: oxygen and the inflammatory cell. **Nature**;422:675e6; 2003.

NERSESYAN, A., KUNDI, M., WALDHERR, M., SETAYESH, T., MIŠÍK, M., WULTSCH, G., FILIPIC, M., MAZZARON BARCELOS, G.R., KNASMUELLER, S. Results of Micronucleus assays with individuals who are occupationally and environmentally exposed to mercury, lead and cadmium. **Mutation Research** 770, 119–139, 2016.

NESCI, S., TROMBETTI, F., PIRINI, M., VENTRELLA, V., PAGLIARANI, A., Mercury and protein thiols: Stimulation of mitochondrial F1FO –ATPase and inhibition of respiration. **Chemico-Biological Interactions** 260, 42 – 49, 2016.

NOCCHETTI, M., DONNADIO, A., AMBROGI, V., ANDREANI, P., BASTIANINI, M., PIETRELLA, D., LATTERINI, L., Ag/AgCl nanoparticle decorated layered double hydroxides: synthesis, characterization and antimicrobial properties. **J. Mater. Chem. B** 1,2383–2393, 2013.

NORDLIND, K., 5 Biological Effects of Mercuric Chloride, Nickel Sulphate and Nickel Chloride. **Progress in Medicinal Chemistry**, 189–233, 1990.

NOWACK, B., BUCHELI, T, D., Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environ. Poll.**, v.150, p.5-22, 2007.

NOWACK, B., RANVILLE, J.F., DIAMOND, S., GALLEGU-URREA, J.A., METCALFE, C., ROSE, J., HORNE, N., KOELMANS, A.A., KLAINE, S.J. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. **Environmental Toxicology and Chemistry** 31, 50 -59, 2012.

OLABARRIETA, I., L'AZOU, B., YURIC, S., CAMBAR, J., CAJARAVILLE, M., In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. **Toxicology in Vitro**, 15, 511–517, 2001.

PAASIVIRTA, J. Chemical Ecotoxicology. Lewis Publishers.210 p., 1991.

PAL R., CHAKRABORTY B., NATH A., SINGH L.M., ALI M., RAHMAN D.S., GHOSH S.K., BASU A, BHATTACHARYA S., BARAL R., SENGUPTA M., Noble metal nanoparticle-induced oxidative stress modulates tumor associated

macrophages (TAMs) from an M2 to M1 phenotype: An in vitro approach. **International Immunopharmacology** 38, 332–341, 2016.

PARK, E.J.; YI, J.; KIM, Y.; CHOI, K.; PARK K.; Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. **Toxicology in Vitro**, 24, 872–878, 2010.

PARK, J.; LIM, D.H.; LIM, H.J.; KWON, T.; CHOI, J.S.; JEONG, S.; CHOI, I.H.; CHEON, J.; Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles **Chem. Commun.**, 47, 4382–4384, 2011.

PARK, M.V.D.Z.; NEIGH, A.M.; VERMEULEN, J.P.; DE LA FONTEYNE, L.J.J.; VERHAREN, H.W.; BRIEDÉ, J.B J.; VAN LOVEREN, H.; DE JONG, W.H.; The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials** 32: 9810e9817; 2011.

PASCHOALINO, M.P.; MARCONE, G.P.S.; JARDIM, W.F. Nanomaterials and the environment, **Quím. Nova**, vol.33,no.2,São Paulo, 2010.

PATTERSON, B., RYAN, J., DICKLEY, J., The Toxicology of Mercury; **The New England journal of medicine**, 350, 946, 2004.

PEREIRA, M. K. **Ressonância de plasmon de superfície localizado e espalhamento Raman em soluções coloidais de ouro**. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PHILLIPS, H. J.; Dye exclusions tests for cell viability. In: Tissue Culture, methods and applications, Kruse, J. R.: Patterson, J. R. M. K. (eds). A. P.: **New York**, p. 406-408, 1973.

PIAO, M.J., KANG, K.A., LEE, I.K., KIM, H.S., KIM, S., CHOI, J.Y., CHOI, J., HYUN, J.W. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. **Toxicol Lett** 201, 92–100, 2011.

PICCINNO, F., GOTTSCHALK, F., SEEGER, S., NOWACK, B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. **J.Nanopart. Res.** 14, 1–11, 2012.

PITHON-CURI, T.C., Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. **Clin Sci.**, v.103, n.4, p.403-8, 2002.

PRASAD, R., Synthesis of silver nanoparticles in photosynthetic plants. **J. Nanopart.** 1–8, 2014.

RAMAMOORTHY, L.; TIZARD, I.R. Induction of apoptosis in a macrophage cell line RAW 264.7 by acemannan, a β -(1,4)-acetylated mannan. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 53, p. 415–421, 1998.

RASCHKE, W.C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. **Cell**, Cambridge, v. 15, p. 261-267, 1978.

REILLY, T. P.; BELLEVEUE, F. H.; WORSTER, P. M.; SVESSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v.55, p. 803-808, 1998.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.; **Mutagênese ambiental**. Ulbra, Canoas, 215 pp. 2003.

RISHER, J.F., DE ROSA, C.T., Inorganic: The Other Mercury; **Journal of Environmental Health**; 70, 9-16, 2007.

ROGAKOU, E.P., PILCH, D.R., ORR, A.H., IVANOVA, V.S., BONNER, W.M., DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, **J. Biol. Chem.** 273, 5858–5868, 1998.

SALVATI A., ABERG C., DOS SANTOS T., VARELA J., PINTO P., LYNCH I., Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: towards models of uptake kinetics. **Nanomedicine: NBM7** :818-26; 2011.

SAMPAIO, S.C.; Espreadamento, fagocitose, atividade fungicida e metabólitos reativos do oxigênio e do nitrogênio – Como avaliar função de macrófagos. Como cultivar células, **PerisCuri**; 2005.

SANTARELLI, L., BRACCI, M., MOCCHEGIANI, E., In vitro and in vivo effects of mercuric chloride on thymic endocrine activity, NK and NKT cell cytotoxicity, cytokine profiles (IL-2, IFN- γ , IL-6): Role of the nitric oxide-L-arginine pathway. **International Immunopharmacology**, 6(3), 376–389, 2006.

SARYAN, L. A.; ZENZ, C.; **Occupational Medicine**, 3rd ed., Mosby – Year Book: St. Louis, 1994.

SEIGNER, H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.120A, p.71-81, 1998.

SHAO, C.C., LI, N., ZHANG, Z.W., SU, J., LI, S., LI, J.L., XU, S.W., Cadmium supplement triggers endoplasmic reticulum stress response and cytotoxicity in primary chicken hepatocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 106, 109-114, 2014.

SHARGEL, L.; YU, A.B.C.; PONG, S.W.; Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 5.ed, New York. Appleton & Lange Reviews, MacGraw- Hill, 892p., 2005.

SHAVANDI, Z., GHAZANFARI, T., NAZARI MOGHADDAM, K., In vitro toxicity of silver nanoparticles on murine peritoneal macrophages, **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 33:1, 135-140. 2011.

SIGNORI, A.M. **Desenvolvimento de uma nova metodologia para preparação de nanopartículas de prata estabilizadas pela Polietilenoimina funcionalizada e aplicação em catálise**. Dissertação de mestrado em química, Brasil, 2010.

SINICROPI, M. S.; AMANTEA, D.; CARUSO, A.; SATURNINO, C. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. **Archives of Toxicology**, 84(7), pp. 501-520, 2010.

SPORN, S.A.; EIERMAN, D.F.; JOHNSON, C.E.; MORRIS, J.; MARTIN, G.; LADNER, M.; HASKILL, S. Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. **J Immunol**; 144,: 4434-4441, 1990.

STEGEMAN, J. J. AND HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. **In Aquatic Toxicology**, pp. 87-203, 1994.

SUN, T.Y., GOTTSCHALK, F., HUNGERBÜHLER, K., NOWACK, B. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. **Environ. Pollut.**(Barking, Essex: 1987) 185, 69–76, 2014.

SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J.; HANKARD, P. K.; WEEKS J. M.; A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 57 20–29, 2004.

SWANSON, J.A., BAER, S.C., Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends in cell biology**, v.5, p. 89-93, 1995.

SYVERSEN, T., KAUR, P., The toxicology of mercury and its compounds. **J. Trace Elem. Med. Biol.** 26, 215–226, 2012.

TEIXEIRA ROSA, R.G.; **Caracterização de nanopartículas de Bi produzidas por ablação a laser**. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade federal do Paraná, Brasil, 2014.

TEODORO, J.S., SIMOES, A.M., DUARTE, F.V., ROLO, A.P., MURDOCH, R.C., HUSSAIN, S.M., PALMEIRA, C.M., Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: a mitochondrial perspective. **Toxicol. In Vitro** 25, 664–670, 2011.

THE ROYAL SOCIETY AND THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. London, UK, 2004.

THIER, R., BONACKER, D., STOIBER, T., BOHM, K. J., WANG, M., UNGER, E., BOLT, H.M., DEGEN, G., Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. **Toxicology Letters**, 140-141, 75– 81, 2003.

TOMANKOVA, K.; HORAKOVA, J.; HARVANOVA, M.; MALINA, L.; SOUKUPOVA, J.; HRADILOVA, S.; KEJLOVA, K.; MALOHLAVA, J.; LICMAN, L.; DVORAKOVA, M.; JIROVA, D.; KOLAROVA, H.; Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology** 82, 106–115, 2015.

TSANGARIS, G.T., TZORTZATOU-STATHOPOULOU, F. Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. **Toxicology** 128, 143 – 150, 1998.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. Vol.13, p.57-149; 2003.

VEGA-AVILA, E., PUGSLEY, M.K., An overview of colorimetric assay methods used 693 to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proc. West. Pharmacol.** 694 Soc. 54, 10–14, 2011.

VERGILIO, C.S., CARVALHO, C.E.V., MELO, E.J.T. Mercury-induced dysfunctions in multiple organelles leading to cell death. **Toxicology in Vitro** 29, 63–71, 2015.

VIARENGO, A., Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Review of Aquatic Sciences**, 1, 295-317, 1989.

VIGNESH, K.S., DEEPE Jr., G.S., Metallothioneins: Emerging Modulators in Immunity and Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, 18, 2197, 2017.

VOCCIA, I., KRZYSTYNIAK, K., DUNIER, M., FLIPO, D., FOURNIER, M. In vitro mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, 29(1-2), 37–48, 1994.

VRCEK, I.V.; ZUNTAR, I.; PETLEVSKI, R.; PAVICIC, I.; SIKIRIC, M.D.; CURLIN, M.; GOOESSLER, W.; Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. **Environ. Toxicol.** 22081, 1-14, 2014.

WANG F., YU L., MONOPOLI M.P., SANDIN P., MAHON E., SALVATI A., DAWSON K.A. The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. **Nanomedicine**. 9(8):1159-68, 2013.

WANG, X.,JI, Z.,CHANG, C.H., ZHANG, H., WANG, M., LIAO, Y.P., LIN, S., MENG, H., LI, R., SUN, B., WINKLE, L.V., PINKERTON, K.E., ZINK, J.I., XIA, T., NEL, A.E. Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of

particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. **Small** 10, 385–98, 2014.

WELLS, P.G.; MCCALLUM, G.P.; CHEN, C.S.; HENDERSON, J.T.; LEE, C.J.; PERSTIN, J.; Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. **Toxicol Sci**; 108:4e18; 2009.

WHO. IPCS — **Environmental Health Criteria 134: cadmium**. Geneva, Schweiz: WHO; p. 1-209, 1992.

XU, Y., WANG, L., BAI, R., ZHANG, T., CHEN, C.; Silver nanoparticles impede phorbol myristate acetate-induced monocyte–macrophage differentiation and autophagy. **Nanoscale**, 7(38), 16100–16109, 2015.

YANAGISAWA, H., NODERA, M., SATO M., MORIDAIRA, K., SATO, G., WADA, O., Decreased Expression of Brain Nitric Oxide Synthase in Macula Densa Cells and Glomerular Epithelial Cells of Rats with Mercury Chloride-Induced Acute Renal Failure. **Toxicology and Applied Pharmacology** 184, 165–171, 2002.

YANO, C.L., MARCONDES, M.C.C.G., Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. **Free Radic. Biol. Med.** 39, 1378 – 1384, 2005.

YU Y.; DUAN J.; LIY.; YU Y.; JIN M.; LI C.; WANG Y.; SUN Z.; Combined toxicity of amorphous silica nanoparticles and methylmercury to human lung epithelial cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 112, 144–152, 2015.

ZAPOLSKA-DOWNAR, D., NARUSZEWICZ, A., ZAPOLSKA-DOWNAR, A., MARKIEWSKI, M., BUKOWSKA, H., MILLO, B., Ibuprofen inhibits adhesiveness of monocytes to endothelium and reduces cellular oxidative stress in smokers and non-smokers. **Eur J Clin Invest.**, 30, 1002-1010, 2000.

ZHAO, R., YU, Q., HOU, L., DONG, X., ZHANG, H., CHEN, X., ZHOU, Z., MA, J., HUANG, S., CHEN, L. Cadmium induces mitochondrial ROS inactivation of XIAP pathway leading to apoptosis in neuronal cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 105715, 2020.

ZHAO, X., TAKABAYASHI, F., IBUK, Y., Coexposure to silver nanoparticles and ultraviolet A synergistically enhances the phosphorylation of histone H2AX. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology** 162, 213–222, 2016.